

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA SEGER

PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA DIAGNÓSTICO E  
IMUNOPROFILAXIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

CURITIBA

2014

JULIANA SEGER

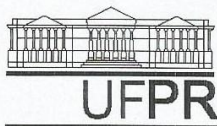
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA DIAGNÓSTICO E IMUNOPROFILAXIA DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração: Parasitologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Vanete Thomaz-Soccol  
Coorientadora: Dra. Silvana Maria Alban

CURITIBA

2014



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“Peptídeos sintéticos para diagnóstico e imunoprofilaxia da  
Leishmaniose Tegumentar Americana”**

**Por**

**JULIANA SEGER**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos  
professores:**

**Profª. Drª. Vanete Thomaz Soccol (presidente)**

**Profª. Drª. Edilene Alcântara de Castro**

**Profª. Drª. Larissa Reifur**

**Drª. Jossimara Polettini**

**Prof. Dr. João Carlos Minozzo**

**Curitiba, 26 de julho de 2014.**

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Pedro e Zeneida,  
pelo amor e apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela presença em minha vida e pela força para superar as dificuldades.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Espero que terminada esta etapa eu possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o amor, apoio e dedicação que constantemente me oferecem.

À minha orientadora, Doutora Vanete Thomaz-Soccol, pela orientação, pelo aprendizado, por ter proporcionado a realização deste desafiador projeto de pesquisa e por todo apoio para que esse trabalho se concretizasse.

À minha co-orientadora, Doutora Silvana Maria Alban, pelo conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos e auxílios na prática de bancada e pelo acompanhamento durante o desenvolvimento de todo projeto.

Ao Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR por ter disponibilizado a infra-estrutura que permitiu o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor Doutor Carlos Ricardo Soccol pelos ensinamentos e pela acolhida ao Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

À Doutora Jamie Scott da Universidade de Simon Fraser pelas bibliotecas de fagos.

Aos Professores João Carlos Minozzo e Edilene Alcântara de Castro pelas contribuições e apontamentos propostos durante a etapa de qualificação.

Ao professor João Carlos Minozzo do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) pelo auxílio durante os experimentos com os hamsters.

Ao técnicos Vanderlei Muller e Cirlei da Silva Pereira e a médica veterinária Thais Andrade Costa Casagrande da Universidade Positivo pelo auxílio durante os experimentos com os hamsters.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial aos doutorandos, Ricardo Cancio Frendich e Ludmila Troiano Araújo, pelo convívio agradável, enriquecedor e pela ajuda em momentos importantes da minha vida.

À professora Doutora Juliana Ferreira de Moura por iniciar a técnica de *Phage display* ao grupo de pesquisa.

Ao Departamento de Patologia da UFPR, seus professores e funcionários.

Expresso também minha gratidão a todos os pacientes que, embora no anonimato, prestaram contribuição fundamental para que este estudo fosse possível.

Às amigas da turma do Mestrado/Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia: Cláudia Bosa, Déberli Fernandes, Alessandra Becker e Rayana Oliveira pela partilha de bons e maus momentos e principalmente pela amizade que construímos.

Às amigas Camila Marconi, Eliana Maria Baldisseira e Aglaé Folador pelo companheirismo, auxílios, preocupações e por serem exemplos de profissionais e de mulheres.

Agradeço os recursos financeiros concedidos pela Fundação Araucária, CNPq e ao plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais – (REUNI).

Em especial agradeço ao meu amor, marido e amigo Luiz Antônio Link por trazer paz e alegria para a minha vida.

A todas as pessoas que contribuíram com gestos, olhares e de alguma forma para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903. Esta doença é uma das principais parasitoses negligenciadas, re-emergentes e afeta cerca de 350 milhões de indivíduos no mundo. O objetivo deste trabalho foi identificar peptídeos miméticos, para uso como antígenos em imunodiagnóstico e imunoprevenção da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Bacteriófagos, expressando peptídeos em sua superfície, foram selecionados por imunoglobulinas específicas para *Leishmania (Vianna) braziliensis* (*L. braziliensis*). Posteriormente os mesmos foram submetidos à extração e sequenciamento do seu DNA. Três peptídeos (P-1, P-2 e P-3) foram identificados, sintetizados e inoculados individualmente ou combinados (MIX) em hamsters *golden*. Os animais imunizados com peptídeos produziram anticorpos que reconheceram diferentes proteínas do antígeno solúvel (AS) de *L. braziliensis*. A comparação das sequências dos três peptídeos, em banco de dados, demonstrou que elas apresentam homologia com glicoproteína de 63 kDa de *Leishmania*, lipofosfoglicano e com outras proteínas hipotéticas de *Leishmania*. Os peptídeos foram avaliados como antígenos no teste ELISA indireto. Dois grupos de pacientes foram investigados, sendo o primeiro constituído por 25 indivíduos que tiveram diagnóstico parasitológico confirmado e o segundo por 57 pacientes que apresentavam suspeita clínica de LTA, eram moradores de área endêmica e que tinham teste sorológico positivo para a doença. Os três peptídeos e o MIX foram imunorreativos contra soro de pacientes dos dois grupos. O peptídeo 1, 2, 3, MIX e AS reagiram com 64, 56, 44/56, 40/72 e 80% das amostras de soro, respectivamente. No Grupo 2, os três peptídeos só ou em combinação foram capazes de diagnosticar 82 a 84% dos indivíduos. Para obtenção do ponto de corte (*Cut-off*) entre soros positivos e negativos dois cálculos foram aplicados. O primeiro foi realizado calculando a média das absorbâncias obtidas para um grupo de indivíduos considerados negativos e acrescidos de dois desvios padrão (2SD) e o segundo foi empregando a Curva ROC (Receiver Operating Characteristics). As sensibilidades do teste ELISA utilizando os peptídeos foram de 64 a 74% para o peptídeo 1, 56 a 65% para o peptídeo 2, 44 a 68% para o peptídeo 3, 40 a 79% para o MIX e de 80 e 91% para o AS. O MIX de peptídeos apresentou o melhor desempenho (79% de sensibilidade) entre os peptídeos seguido do P-1 (74%). A aplicação do teste t sugeriu que o P-1 seria melhor alternativa entre os peptídeos para o diagnóstico da LTA. As especificidades dos antígenos variaram de 92 a 100% demonstrando a habilidade destes em diagnosticar corretamente os indivíduos saudáveis. Reações cruzadas com soros de pacientes com doença de chagas, hanseníase e tuberculose foram avaliadas contra todos os antígenos. A reação cruzada com soro de pacientes com doença de chagas foi 0% para o P-1 enquanto que para o AS foi 60%. Os peptídeos sintéticos também foram testados em ensaios de imunoproteção contra leishmaniose experimental (LE) em hamsters. Foi possível observar que os animais do grupo controle positivo (que receberam o desafio com *L. braziliensis* e não receberam peptídeos) apresentaram lesões específicas de LE, enquanto que os animais imunizados com os peptídeos individualmente ou em combinação não apresentaram lesões ou as apresentaram em menor número. Os animais que receberam o peptídeo 2 não desenvolveram

lesões. Promastigotas de *L. braziliensis* foram isoladas, em meio de cultura, da pata, baço e fígado de animais de todos os grupos, com exceção do grupo dois e do grupo controle negativo. Essas análises demonstram que a metodologia selecionada para a realização dessa pesquisa foi adequada, visto que sequências peptídicas com homologia aos principais fatores de virulência de *Leishmania* sp. foram obtidas, resultados promissores em testes sorológicos de diagnóstico foram alcançados e imunoproteção de animais contra a leishmaniose experimental foi observada.

Palavras-chave: *Phage display*. leishmaniose. ELISA. Vacinas.



## ABSTRACT

Leishmaniosis are caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* Ross, 1903. This is one of the main neglected, re-emerging parasitic diseases and affects about 350 million people worldwide. The objective of this study was to identify mimetic peptides to use as antigens in immunodiagnosis and immunoprophylaxis of American Cutaneous Leishmaniosis (ACL). Bacteriophages expressing peptides on their surface were selected by specific immunoglobulins for *Leishmania* (*Vianna*) *braziliensis* (*L. braziliensis*). Subsequently, they were subjected to DNA extraction and sequencing. Three peptides (P-1, P-2 e P-3) were identified, synthesized and individually or combined (MIX) inoculated in *Golden* hamsters. Animals immunized with peptides produced antibodies that recognized different proteins from the Soluble Antigen (SA) from *L. braziliensis*. Comparison of the sequences of the three peptides in database showed that they have similarity with a 63 kDa glycoprotein of *Leishmania*, a lipophosphoglycan and other hypothetical proteins of *Leishmania*. The peptides were evaluated as antigens in indirect ELISA. Two groups of patients were studied: the first consists of 25 individuals who had confirmed parasitological diagnosis and the second group of 57 patients who had clinical suspicion of ACL and were residents of endemic area and also had a positive serologic test for the disease. The three peptides and the MIX were immunoreactive against sera of patients in both groups. Peptide 1, 2, 3, MIX and AS were reactive with 64, 56, 44/56, 40/72 and 80% sera samples, respectively. In Group 2, the three peptides alone or in combination were able to diagnose 82 a 84% of individuals. In order to obtain the cut-off between positive and negative sera, two calculations were applied. The first one was conducted by calculating the mean absorbance obtained for a group of individuals considered negative plus two standard deviations (2SD). The second calculation was using the ROC curve (Receiver Operating Characteristics). The sensibility of the ELISA assay using the peptides were 64 to 74% for peptide 1, 56 to 65% for peptide 2, 44 to 68% for peptide 3, 40 to 79% for the MIX and 80 to 91% for the SA. The MIX of peptides showed the best performance (79%) among the peptides followed by P-1 (74%). The application of the t-test suggested that P-1 was the best alternative among the peptides for the diagnosis of ACL. The specificities of antigens ranged from 92% to 100% demonstrating the ability to correctly diagnose the healthy individuals. Cross-reactions with sera from patients with Chagas disease, leprosy and tuberculosis were evaluated against all antigens. Cross-reactivity with Chagas disease was zero for the P-1 and 60% for SA. The synthetic peptides were also tested in assays of immune protection against experimental Leishmaniosis (EL) in hamsters. It was possible to observe that the animals in the positive control group (that received a challenge with *L. braziliensis* and did not receive peptides) presented specific lesions of EL, whereas animals immunized with the peptides alone or in combination presented a few or no lesions. The animals receiving the peptide 2 did not develop lesions. Promastigotes of *L. braziliensis* were isolated in culture medium from the paw, spleen and liver from animals of all groups except group 2 and negative control group. These analysis show that the methodology selected for this study was appropriate. Since peptide sequences with homology to the main virulence factors of *Leishmania* sp. were obtained, promising results in serological diagnostic tests were achieved and immune protection of animals against EL was observed.

Keywords: Phage display. Leishmaniosis. ELISA. Vaccines.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 -	CICLO BIOLÓGICO DE <i>Leishmania</i> sp.....	25
FIGURA 2 -	ENDEMICIDADE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO MUNDO EM 2012.....	28
FIGURA 3 -	PRINCÍPIO BÁSICO DO RASTREAMENTO DE FAGOS DE INTERESSE.....	36

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 -	PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	61
FIGURA 2 -	ETAPA INICIAL DA TÉCNICA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> ....	70
FIGURA 3 -	ETAPAS DO TESTE ELISA ELISA INDIRETO PARA AVALIAR A REATIVIDADE DOS FAGOS DOS <i>PANNINGS</i> .....	72
FIGURA 4 -	ETAPAS DA REALIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS.....	73
FIGURA 5 -	GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS.....	77
FIGURA 6 -	SDS-PAGE DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. amazonensis</i> .....	80
FIGURA 7 -	SDS-PAGE DE IgGs TOTAIS DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR PURIFICADAS POR PRECIPITAÇÃO POR SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	81
FIGURA 8 -	REATIVIDADE DE IgGs TOTAIS DE PACIENTES COM LTA FRENTE A ANTÍGENOS DE <i>L. braziliensis</i> e <i>L. amazonensis</i> - REAÇÃO OBSERVADA EM <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	82
FIGURA 9 -	REATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS POR ELISA.....	83
FIGURA 10 -	(A) - PLACA APRESENTANDO A REAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO PELA TÉCNICA ELISA DEMONSTRANDO O AUMENTO DA REATIVIDADE A CADA CICLO DE SELEÇÃO (B) - ABSORBÂNCIA OBTIDA DE CADA CICLO DE SELEÇÃO EMPREGANDO-SE O TESTE ELISA.....	84
FIGURA 11 -	TESTE ELISA PARA SELEÇÃO DOS FAGOS FRENTE A SOROS DE PACIENTES PORTADORES DE ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i> .....	85
FIGURA 12 -	PRODUÇÃO DE IgG NO SORO DE HAMSTERS IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO 1, 2, 3 OU COM UM MIX DOS TRÊS PEPTÍDEOS POR ELISA.....	88
FIGURA 13 -	REATIVIDADE DE IgGs DE HAMSTERS INOCULADOS COM PEPTÍDEOS FRENTE A ANTÍGENOS DE <i>L. braziliensis</i> por <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	89

## CAPÍTULO 2

FIGURA 1 -	TÉCNICA ALA – SCAN .....	109
FIGURA 2 -	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA INDIRETO REALIZADO COM O PEPTÍDEO 1 E O SORO DE 34 INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	116
FIGURA 3 -	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA INDIRETO REALIZADO COM MIX DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS (A) OU ANTÍGENO SOLÚVEL (B) DE <i>Leishmania braziliensis</i> FRENTE AO SORO DE 57 INDIVÍDUOS COM SUSPEITA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	117
FIGURA 4 -	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA INDIRETO REALIZADO 48 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS FRENTE SOROS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (BARRAS CLARAS) OU COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (BARRAS ESCURAS)...	119
FIGURA 5 -	RESULTADO INICIAL DOS SOROS DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO FRENTE AOS ANTÍGENOS DO ESTUDO.....	121
FIGURA 6 -	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA UTILIZANDO SORO DE PACIENTES DO GRUPO 1 (TESTE PARASITOLÓGICO POSITIVO) FRENTE AOS ANTÍGENOS P1 (PEPTÍDEO 1), P2 (PEPTÍDEO 2), P3 (PEPTÍDEO 3), MIX (P1+P2+P3) OU AS (ANTÍGENO SOLÚVEL).....	122
FIGURA 7 -	ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA UTILIZANDO SORO DE PACIENTES DO GRUPO 2 (TESTE SOROLÓGICO POSITIVO) FRENTE AOS ANTÍGENOS P1 (PEPTÍDEO 1), P2 (PEPTÍDEO 2), P3 (PEPTÍDEO 3), MIX (P1+P2+P3) OU AS (ANTÍGENO SOLÚVEL).....	123
FIGURA 8 -	REATIVIDADE DO PEPTÍDEO 1, PEPTÍDEO 2, PEPTÍDEO 3, MIX E AS CONTRA O SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (NEG) OU COM LTA (G1=GRUPO 1 E G2=GRUPO 2) – 2SD (CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO).....	124
FIGURA 9 -	REATIVIDADE DO PEPTÍDEO 1, PEPTÍDEO 2, PEPTÍDEO 3, MIX E AS CONTRA O SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (NEG) OU COM LTA (G1=GRUPO 1 E G2=GRUPO 2) - CURVA ROC (RECEIVER OPERATING CHARACTERSTICS).....	124
FIGURA 10 -	REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL CONTRA O SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS HANSENÍASE E TUBERCULOSE (PONTO DE CORTE DEFINIDO PELA MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO MAIS DOIS DESVIOS PADRÃO.....	128

FIGURA 11 -	REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL CONTRA O SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS HANSENÍASE E TUBERCULOSE (PONTO DE CORTE FORNECIDO PELA CURVA ROC).....	129
FIGURA 12 -	CURVAS ROC PARA O ANTÍGENO SOLÚVEL (AS) E PEPTÍDEOS INDIVIDUALMENTE OU EM COMBINAÇÃO (MIX) NOS GRUPOS 1 E 2.....	132
FIGURA 13 -	SENSIBILIDADES, INTERVALOS DE CONFIANÇA, ANTÍGENOS, GRUPOS E SEUS RESPECTIVOS CÁLCULOS PARA OBTENÇÃO DA LINHA DE CORTE.....	134
FIGURA 14 -	ESPECIFICIDADES, INTERVALOS DE CONFIANÇA, ANTÍGENOS, GRUPOS E SEUS RESPECTIVOS CÁLCULOS PARA OBTENÇÃO DA LINHA DE CORTE.....	134
FIGURA 15 -	ALGORITMO PROPOSTO PARA DIAGNOSTICO LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	140

### **CAPÍTULO 3**

FIGURA 1 -	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DEMONSTRANDO RESUMIDAMENTE AS ETAPAS DO EXPERIMENTO REALIZADO.....	155
FIGURA 2 -	CRONOGRAMA DEMONSTRANDO RESUMIDAMENTE AS ETAPAS DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL REALIZADO.....	155
FIGURA 3 -	LESÕES TÍPICAS DE LEISHMANIOSE EM HAMSTER, 120 DIAS APÓS O DESAFIO COM $10^6$ CEPAS DE <i>L. braziliensis</i> .....	158
FIGURA 4 -	PRODUÇÃO DE IgG E IgG2a POR ANIMAIS IMUNIZADOS COM OS PEPTÍDEOS ISOLADOS OU EM MIX E POSTERIORMENTE DESAFIADOS COM <i>L. braziliensis</i> . ....	160

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1 - FORMAS CLÍNICAS E PRINCIPAIS ESPÉCIES DE <i>Leishmania</i> QUE ACOMETEM O HOMEM.....	27
TABELA 2 - TRABALHOS QUE BUSCARAM DESENVOLVER TESTES ELISA INDIRETO PARA LEISHMANIOSE RELACIONANDO AUTORES, ANO, SENSIBILIDADES E ESPECIFICIDADES OBTIDAS, FORMA CLÍNICA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS E OBSERVAÇÕES.....	38
TABELA 3 - VACINAS DE SEGUNDA GERAÇÃO TESTADAS PARA LEISHMANIOSE, RELACIONANDO AUTORES, ANO, ANTÍGENOS, MÉTODOS PARA OBTENÇÃO, MODELO EXPERIMENTAL/CEPA, CEPA TESTADA, RESULTADOS E ALGUMAS OBSERVAÇÕES.....	42

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS HAMSTERS COM OS PEPTÍDEOS-KLH.....	78
TABELA 2 - FAGOS DE ENTRADA E SAÍDA OBTIDOS DA BIOSSELEÇÃO POR <i>PHAGE DISPLAY</i> COM ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS.....	85
TABELA 3 - SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> PARTINDO DE IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICAS PARA <i>Leishmania</i> sp.....	86
TABELA 4 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 1 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank.....	86
TABELA 5 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 2 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank.....	87
TABELA 6 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 3 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank.....	87

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PLACA DE ELISA UTILIZADA PARA A ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDEO (0,125, 0,250, 0,5 e 1 µg) POR POÇO DA PLACA, DA DILUIÇÃO DO CONJUGADO (1:5.000, 1:10.000 e 1:15.000) E DOS SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS TESTADOS (1:25, 1:50 e 1:100).....	115
TABELA 2 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS APÓS LEITURA DA PLACA COM REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA APRESENTADA NA TABELA 1.....	115

TABELA 3 -	MÉDIAS DAS ABSORBÂNCIAS, DESVIO PADRÃO, VALOR DE P DOS GRUPOS 1 E 2 FRENTE AOS ANTÍGENOS DO ESTUDO.....	122
TABELA 4 -	ABSORBÂNCIAS E RESULTADOS OBTIDOS APÓS REALIZAÇÃO DE TESTE ELISA COM SORO DE PACIENTES DO GRUPO 1 (TESTE PARASITOLÓGICO POSITIVO) CONTRA O PEPTÍDEO 1, PEPTÍDEO 2, PEPTÍDEO 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL.....	127
TABELA 5 -	VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA COM OS PEPTÍDEOS 1, 2, 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL.....	130
TABELA 6 -	VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA COM OS PEPTÍDEOS 1, 2, 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL.....	131
TABELA 7 -	COMPARAÇÃO GERAL DAS SENSIBILIDADES E ESPECIFICIDADES OBTIDAS.....	133
TABELA 8 -	CONCORDÂNCIA DOS TESTES ELISA REALIZADOS COM O P-1, P-2, P-3 OU MIX <i>VERSUS</i> ANTÍGENO SOLÚVEL EM SOROS DO GRUPO 1 E 2 CONSIDERANDO A UTILIZAÇÃO DO CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA LINHA DE CORTE INICIAL.....	135
TABELA 9 -	CONCORDÂNCIA DOS TESTES ELISA REALIZADOS COM O P-1, P-2, P-3 OU MIX <i>VERSUS</i> ANTÍGENO SOLÚVEL EM SOROS DO GRUPO 1 E 2 CONSIDERANDO A UTILIZAÇÃO DO CÁLCULO DA CURVA ROC PARA DETERMINAÇÃO DA LINHA DE CORTE INICIAL.....	135
TABELA 10 -	VALOR PREDITIVO POSITIVO E NEGATIVO DO TESTE ELISA COM OS PEPTÍDEOS 1, 2, 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL.....	136
TABELA 11 -	PRECISÃO DOS TESTES ELISA AVALIADOS.....	137

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 -	GRUPOS EXPERIMENTAIS E LESÕES CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL EM HAMSTERS 75 DIAS APÓS O DESAFIO.....	159
TABELA 2 -	GRUPOS EXPERIMENTAIS E LESÕES CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL EM HAMSTERS 120 DIAS APÓS O DESAFIO.....	159
TABELA 3 -	GRUPOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS REFERENTES À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE <i>L. braziliensis</i> NOS TECIDOS ANIMAIS APÓS CULTURA.....	160

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	- Aminoácido
Abs	- Absorbância
ALA	- Alanina
BCG	- Bacilo Calmette-Guérin
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta para Pesquisa Básica de Alinhamento Local)
BSA	- Soro Albumina Bovina
CL	- Células de Langerhans
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
AS	- Antígeno solúvel
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
Espec.	- Especificidade
Fmoc	- Fluorenil metil oxicarbonila
HRP	- <i>Horseradish Peroxidase</i>
IDR	- Intradermoreação
IFN	- Interferon
Ig	- imunoglobulina
IgG	- imunoglobulina G
IL	- Interleucina
LB	- Meio de cultura Luria-Bertani
LTA	- leishmaniose tegumentar americana
LV	- leishmaniose visceral
NNN	- Meio bifásico Novy-McNeal-Nicolle
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OPD	- Ortofenilenodiamina
PAMPs	- Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PBS - T	- Tampão Fosfato Salino com adição do detergente Tween 20
PEG	- Polietilenoglicol
PSG	- Gel secretório de promastigotas
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno

RNA	- Ácido Ribonucleico
Sens.	- Sensibilidade
SDS-PAGE	- Sódio Dodecil Sulfato - Eletroforese em gel de Poliacrílamida
TBS	- Tampão Fosfato Tris
TBS - T	- Tampão Fosfato Tris com adição de Tween 20
Th	- Linfócitos T <i>Helper</i>
TNF	- Fator de necrose tumoral
TLRs	- Receptores toll-like
UI	- Unidade Internacional
WB	- <i>Western Blotting</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

g	- Força gravitacional
kDa	- Quilo Dalton
M	- Mol
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
mm	- Milímetros
nm	- Nanômetros
rpm	- Rotações por minuto
V	- Voltagem
°C	- Grau Celsius
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
%	- Por cento
®	- Marca registrada
X	- Vezes
W	- Watt
UV	- Ultra-violeta

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
2.1 LEISHMANIOSE.....	24
2.2 FORMA CLÍNICA DA DOENÇA.....	26
2.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....	27
2.4 INTERAÇÃO PARASITO/HOSPEDEIRO NA LEISHMANIOSE.....	29
2.5 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES.....	32
2.6 <i>PHAGE DISPLAY</i> NA SELEÇÃO DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE.....	34
2.7 IMUNOPROFILAXIA DA LEISHMANIOSE.....	39
2.8 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	44
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 GERAL.....	57
3.2 ESPECÍFICOS.....	57
 <b>CAPÍTULO 1.....</b>	 <b>58</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
2.1 DELINEAMENTO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ESTUDO.....	61
2.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	61
2.3 AMOSTRAS DE SOROS DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	62
2.4 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>Leishmania braziliensis</i> E DE <i>L.</i> <i>amazonensis</i> .....	62
2.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. amazonensis</i> .....	63
2.6 SELEÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A <i>L. braziliensis</i> PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> .....	64
2.7 PRECIPITAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS CONTRA <i>Leishmania</i> COM SULFATO DE AMÔNIO.....	65
2.7.1 SDS-PAGE para avaliação da purificação das imunoglobulinas por precipitação com sulfato de amônio.....	66
2.8 OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DA SUB- CLASSE G (IgGs).....	66
2.9 OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICA PARA <i>L.</i> <i>braziliensis</i> .....	67
2.9.1 Avaliação da purificação e reatividade das imunoglobulinas específicas anti- <i>L. braziliensis</i> obtidas por <i>western blotting</i> .....	68
2.10 TÉCNICA <i>PHAGE DISPLAY</i> : EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS NA SUPERFÍCIE DE FAGOS.....	69
2.11 ELISA INDIRETO PARA AVALIAR A REATIVIDADE DOS FAGOS DOS <i>PANNINGS</i> .....	71
2.12 AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS.....	73
2.13 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS.....	74

2.14 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS.....	75
2.15 CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS A PROTEÍNA CARREADORA KLH...	76
2.16 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS.....	76
2.17 ELISA PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-PEPTÍDEOS.....	78
2.18 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE IgGs DE HAMSTERS INOCULADOS COM PEPTÍDEOS FRENTE A ANTÍGENOS DE <i>L. braziliensis</i> .....	79
<b>3 RESULTADOS</b> .....	80
3.1 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS.....	80
3.2 SDS-PAGE DE ANTÍGENOS DE <i>L. braziliensis</i> E <i>L. amazonensis</i> .....	81
3.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	81
3.4 PHAGE DISPLAY.....	84
3.5 SELEÇÃO DOS CLONES.....	85
3.6 OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS.....	86
3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-PEPTÍDEOS.....	87
3.8 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR HAMSTERS FRENTE AO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. braziliensis</i> .....	89
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	96
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	97
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	98
 <b>CAPÍTULO 2</b> .....	 102
<b>RESUMO</b> .....	102
<b>ABSTRACT</b> .....	103
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	104
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	107
2.1 AMOSTRAS DE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS.....	107
2.2 CULTURA DO PARASITO PROVENIENTE DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PARA PESQUISA DE <i>Leishmania braziliensis</i> .....	107
2.3 PREPARO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>Leishmania braziliensis</i> .....	108
2.4 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY.....	109
2.5 AVALIAÇÃO DO ANTÍGENOS SOLÚVEL DE <i>L. braziliensis</i> EM TESTE ELISA INDIRETO.....	110
2.6 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO TESTE ELISA INDIRETO.....	110
2.7 AVALIAÇÃO DO PONTO DE CORTE E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	110
<b>3 RESULTADOS</b> .....	113
3.1 AMOSTRAS DE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS.....	113
3.2 CULTURA DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PARA PESQUISA DE <i>Leishmania braziliensis</i> .....	113
3.3 AVALIAÇÃO DOS SOROS NO TESTE ELISA INDIRETO UTILIZANDO-SE O ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>Leishmania braziliensis</i> .....	113
3.4 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO TESTE ELISA INDIRETO.....	114

3.5 COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL.....	121
3.6 REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL FRENTE A SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS E DOENTES EM TESTE ELISA.....	123
3.7 REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL NO TESTE ELISA CONTRA SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS, HANSENÍASE OU TUBERCULOSE.....	127
3.8 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL NO TESTE ELISA UTILIZANDO O CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÕES.....	130
3.9 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL NO TESTE ELISA UTILIZANDO CÁLCULO ROC.....	130
3.10 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE OBTIDOS.....	133
3.11 CONCORDÂNCIA DOS PEPTÍDEOS COM O ANTÍGENO SOLÚVEL EM TESTE ELISA.....	135
3.12 VALOR PREDITIVO POSITIVO E NEGATIVO DO TESTE ELISA COM PEPTÍDEOS E ANTÍGENO SOLÚVEL.....	136
3.13 PRECISÃO DOS TESTES ELISA COM OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E COM O ANTÍGENO SOLÚVEL.....	137
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>138</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>142</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>143</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>144</b>
 <b>CAPÍTULO 3.....</b>	 <b>149</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>149</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>150</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>151</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>154</b>
2.1 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS EM MODELO EXPERIMENTAL.....	154
2.2 ISOLAMENTO DO PARASITO POR CULTURA EM ÓRGÃOS DOS ANIMAIS DESAFIADOS.....	156
2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG TOTAL E DAS SUB-CLASSES IgG1 E IgG2a.....	156
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>158</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>161</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>164</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>165</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>166</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>179</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada com uma Introdução Geral, onde são apresentados os protozoários do gênero *Leishmania* e a doença causada por esses parasitos, suas principais características e as relações parasito-hospedeiro. Em seguida, são apresentados os objetivos, geral e específicos. Posteriormente, três capítulos abordam diretamente o desenvolvimento das tecnologias realizadas, os resultados e discussão de cada etapa do trabalho. As conclusões gerais encerram a tese. Os capítulos estão assim dispostos:

**Capítulo 1:** *Phage display* para seleção de antígenos de *Leishmania braziliensis*.

**Capítulo 2:** Peptídeos sintéticos no imunodiagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

**Capítulo 3:** Peptídeos sintéticos na imunoprevenção da leishmaniose experimental.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses estão entre as principais parasitoses negligenciadas, re-emergentes e afetam em torno de 350 milhões de indivíduos no mundo (OMS, 2013). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* ROSS, 1903 e infecta humanos nas Américas, África, Ásia e Europa. Na América Latina a leishmaniose cutânea (LC) é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e é causada por diferentes agentes etiológicos: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffii*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. A leishmaniose visceral (LV) é causada por *Leishmania infantum* (sinonímia *L. chagasi*) que é mais severa podendo causar a morte na ausência de diagnóstico correto e tratamento precoce (LAINSON, 1983; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

A LTA vem chamando atenção das autoridades em saúde pública pelo aumento do número de casos. No Brasil a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todos os estados. Observam-se picos de transmissão aproximadamente a cada cinco anos, com aumento do número de casos a partir do ano de 1985. O número de casos de LTA, por ano, saltou de aproximadamente 3.000, nos anos 80, para 37.710 em 2005. No período de 1985 a 2005, verificou-se média anual de 28.568 casos autóctones registrados (BRASIL, 2010).

Avanços foram realizados no que diz respeito ao diagnóstico e à prevenção da LTA durante a última década. Entretanto, ainda não há um método único que possa ser adotado como padrão ouro, quer seja para o diagnóstico ou ainda para prevenção da doença (ANDRADE *et al.*, 2001). Dentro deste contexto torna-se necessária a busca por antígenos purificados, de alta sensibilidade e segurança para o diagnóstico e prevenção da LTA.

Uma técnica que permite a busca de alvos antigênicos é a técnica de *Phage display* que se destaca na seleção de mimotopos (sequências proteicas que apresentam similaridades com o epítopo original) ou epítomos contínuos e descontínuos baseados na reação antígeno-anticorpo. Uma vez que bacteriófagos de uma biblioteca conhecida sejam selecionados pelos anticorpos presentes no soro de pacientes com determinada doença, o seu DNA pode ser extraído e seqüenciado.

O peptídeo identificado pode ser sintetizado quimicamente para uso em imunizações e imunodiagnósticos (SOMPURAM *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2003; HAMBY *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2006; GAUCI *et al.*, 2012).

Buscando peptídeos alvo, este trabalho visou identificar mimotopos ou epítomos que possam ser sintetizados e avaliados quanto ao seu potencial para diagnóstico sorológico e também na habilidade de ativação de linfócitos. Esta última propriedade seria de particular importância, uma vez que os peptídeos sintéticos poderiam ser também utilizados em protocolos vacinais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

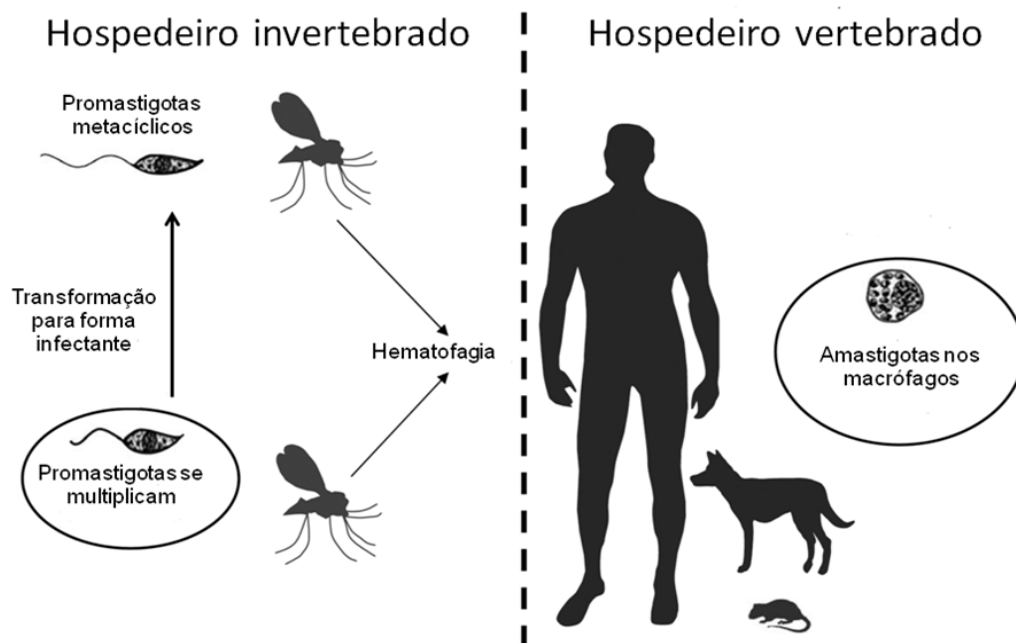
### 2.1 LEISHMANIOSE

Apesar dos avanços observados na ciência, tecnologia e medicina nas últimas décadas, percebe-se que a sociedade ainda não conseguiu alocar recursos suficientes para lutar contra as doenças que afetam principalmente as populações mais carentes. Essas doenças, chamadas negligenciadas, não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido geralmente não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, novos métodos de diagnóstico e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (TROUILLER *et al.*, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os vetores ou hospedeiros invertebrados da *Leishmania* sp. são insetos hematófagos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*. Nos mamíferos, a infecção se inicia quando, no momento da hematofagia, a fêmea do vetor regurgita formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* juntamente com componentes imunomodulatórios presentes em sua saliva e no gel secretório (PSG) do aparelho digestório destes insetos. Estes protozoários são internalizados por células fagocíticas, se transformam em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária dentro de vacúolos parasitários no citoplasma destas células. O ciclo biológico de *Leishmania* sp. se completa quando as formas amastigotas presentes são ingeridas por flebotomíneos durante o repasto sanguíneo e se diferenciam em formas promastigotas flageladas no intestino dos insetos vetores. Os promastigotas se multiplicam por divisão binária e passam por um processo denominado metaciclogênese, deixando assim de se reproduzir e tornam-se infectantes



(promastigotas metacíclicas). Durante esta etapa as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo (FIGURA 1) (LIPOLDOVA e DEMANT, 2006; BRASIL, 2010; ROUGERON *et al.*, 2010; SCOTT e KAYE, 2011).



**FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania* sp.** Adaptado de ROUGERON *et al.*, 2010. O flebótomo, no momento da hematofagia, pica um indivíduo infectado ou um reservatório e pode inocular formas promastigotas metacíclicas que se transformarão em amastigotas e se multiplicarão no interior dos macrófagos. Quando outro flebótomo durante o repasto sanguíneo aspira macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou em tecidos, as amastigotas, ao atingirem o intestino médio do inseto se transformam em promastigotas. Estas formas flageladas, após rápida multiplicação, se convertem nos promastigotas infectantes e migratórios que poderão ser introduzidas na pele do próximo hospedeiro ou reservatório.

A maioria das espécies de *Lutzomyia* sp. está adaptada ao ambiente modificado pelo homem, sendo comum encontrá-los em galinheiros, chiqueiros, canil, paiol entre outros, onde as fêmeas encontram animais para seu repasto sanguíneo (LAINSON e RANGEL, 2005).

A interação reservatório-parasito é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmico, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente. Apesar de existirem exceções, em geral as leishmanioses constituem

zoonoses de animais silvestres, e mais raramente domésticos, incluindo marsupiais, desdentados, carnívoros e mesmo primatas. Já o homem, nas Américas, parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza (GONTIJO e CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010).

## 2.2 FORMA CLÍNICA DA DOENÇA

A forma clínica da doença se desenvolve após a inoculação do parasito no homem e está intimamente associada à resposta imune do hospedeiro à espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasita com seu hospedeiro (SARAVIA *et al.*, 1985).

No homem, a doença ocorre em quatro formas clínicas principais: cutânea localizada, muco-cutânea, cutânea-difusa e visceral. A forma visceral é a mais grave da doença e pode causar febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, chegando a ser fatal se não for tratada (DESJEUX, 2004).

No Brasil *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* são as principais espécies causadoras da LTA. Todas as três espécies podem produzir a forma clínica mais comum da doença, a cutânea localizada, caracterizada por lesão na pele que pode curar espontaneamente após algumas semanas ou meses, mas pode deixar cicatrizes permanentes. Esta lesão começa com uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação do parasito pelo mosquito infectado. A pápula aumenta lentamente e ulcerar para formar uma úlcera crônica de fundo granuloso e bordas salientes. Uma ou mais úlceras podem se desenvolver. O período de incubação é, tipicamente, de duas a quatro semanas, mas pode se estender de dias ou até mesmo anos (ROSEN, 1994, BRASIL, 2010). A forma muco-cutânea inicia-se com úlceras simples de pele, porém se não tratada adequadamente podem, após cinco a 10 anos produzir metástases na região oronasal, causando destruição tecidual, em alguns casos extremamente mutilantes (DESJEUX, 2004). A forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas e são mais difíceis de curar. Estas lesões múltiplas contêm alto número de parasitos e são causadas por *L. amazonensis*, no Brasil. Ao contrário da forma muco-cutânea, que induz a um aumento da imunidade celular do hospedeiro, a leishmaniose cutânea-difusa é caracterizada por ausência

de resposta celular e não responde ao teste de intradermorreação (IDR), que traduz resposta de hipersensibilidade celular (LAINSON, 1983).

### 2.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

As principais espécies de *Leishmania* que afetam o homem tanto no Novo como no Velho Mundo, bem como a forma clínica relacionada a cada espécie são listadas na TABELA 1.

TABELA 1 - FORMAS CLÍNICAS E PRINCIPAIS ESPÉCIES DE *Leishmania* QUE ACOMETEM O HOMEM

<b>Espécie de <i>Leishmania</i></b>	<b>Formas clínicas habituais</b>	<b>Excepcionalmente</b>
<i>L. donovani</i>	LV, LDPK	LCL
<i>L. infantum</i>	LV	LCL, LCD <sup>a</sup>
<i>L. major</i>	LCL	LCD <sup>a</sup>
<i>L. tropica</i>	LCL	LV
<i>L. aethiopica</i>	LCL	LCD
<i>L. mexicana</i>	LCL	LCD, LV <sup>a</sup>
<i>L. amazonensis</i>	LCL	LCD, LV <sup>b</sup>
<i>L. guyanensis</i>	LCL	
<i>L. panamensis</i>	LCL	LCM, LCD <sup>a</sup>
<i>L. naiffi</i>	LCL	
<i>L. lainsoni</i>	LCL	
<i>L. shawi</i>	LCL	
<i>L. peruviana</i>	LCL	
<i>L. braziliensis</i>	LCL + LCM	LCD <sup>a</sup> , LV <sup>a</sup>

LV: leishmaniose visceral, LCL: leishmaniose cutânea-localizada, LCD: leishmaniose cutânea-difusa, LCM: muco-cutânea, LDPK: leishmaniose dérmica pós kalazar, <sup>a</sup>: durante imunossupressão, <sup>b</sup>: incerto. Adaptado de DEDET, 2007.

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LTA constitui problema de Saúde Pública (FIGURA 2). Esta doença tem ampla distribuição mundial e no Continente Americano há registro de casos desde o extremo Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai.

A LTA é uma doença endêmica em vários Estados do Brasil, incluindo o Estado do Paraná. Dos 13.384 casos registrados na região Sul do país no período de 1980 a 2005, 98,7% ocorreram no Paraná. Neste Estado, os casos de LTA estão distribuídos em 276 municípios e a transmissão autóctone é encontrada em três regiões: no Vale do Ribeira; no Norte do Estado e na região Central (LUZ *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2005; TEODORO *et al.*, 2006; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009; BRASIL, 2010).

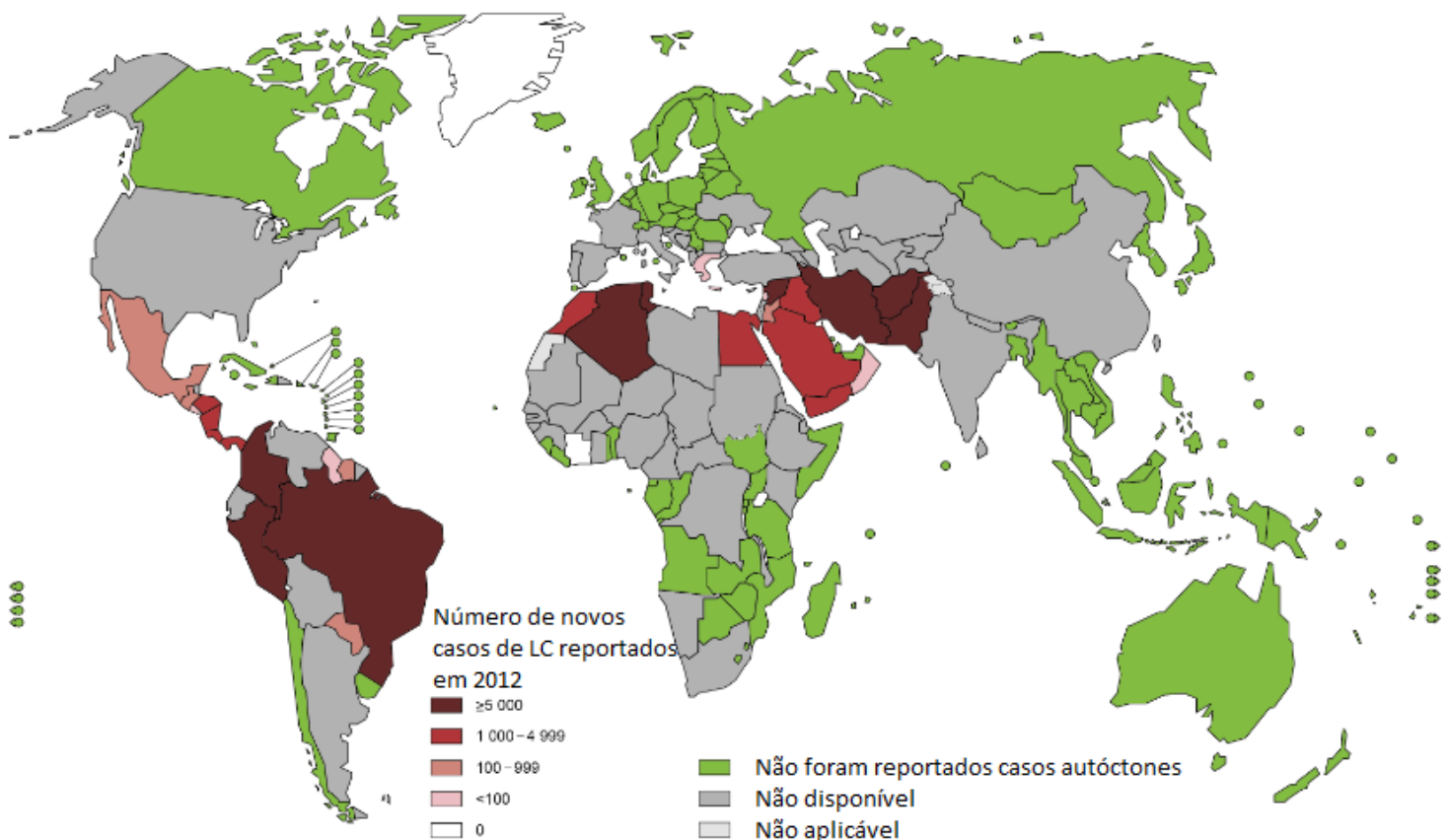


FIGURA 2 - ENDEMICIDADE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO MUNDO EM 2012. Fonte: OMS, 2012

As ações antrópicas no ambiente, a urbanização crescente e as pressões sócio econômicas têm expandido as áreas endêmicas e o aparecimento de focos da LTA em zonas urbanas. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO e CARVALHO, 2003; DIAS *et al.*, 2007; BRASIL, 2010).

O aumento do número de casos de LTA no Brasil requer cuidados imediatos que privilegiem o preparo de profissionais da área de saúde para a identificação da doença e o suprimento de recursos laboratoriais e medicamentos, pois a deficiência desses fatores tem prejudicado o diagnóstico e tratamento adequados da doença (MARSDEN, 1985; SILVEIRA *et al.*, 1996).

## 2.4 INTERAÇÃO PARASITO/HOSPEDEIRO NA LEISHMANIOSE

A indução de resposta imune do hospedeiro frente a um antígeno requer uma série de interações complexas entre diferentes tipos celulares (e seus produtos), com a secreção orquestrada de proteínas, receptores de superfície e sinalizações de vias e processos intracelulares ocorrendo todos de maneira altamente especializada (GUERMONPREZ *et al.*, 2002).

Após a entrada do parasito no hospedeiro, vários mecanismos de defesa são ativados. Dependendo da espécie do parasito e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, a infecção pode causar um espectro de doença que varia de lesões autocicatrizantes a infecções disseminadas e fatais (MOSSER *et al.*, 1986).

A incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção está aparentemente relacionada a dois fatores principais: a habilidade de algumas cepas de *Leishmania* resistirem aos efeitos microbicidas dos eventos de imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, bem como o estabelecimento de um perfil de imunidade celular e humoral pelo hospedeiro vertebrado que favoreça um microambiente apropriado para a instalação do parasito no sistema mononuclear fagocitário (GRIMALDI e TESH, 1993).

A manifestação da doença requer mecanismos que permitam a multiplicação do parasito no hospedeiro e sua resistência, pelo menos inicialmente, às defesas imunes inatas e adquiridas. Vários componentes da resposta imune inata participam do mecanismo de defesa contra *Leishmania* sp. Estudos sugerem que micro-organismos patogênicos podem modular ou interferir no reconhecimento de padrões mediados pelos receptores *toll-like* (TLRs). TLRs do hospedeiro reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e isso induz produção de sinais responsáveis pela ativação de genes importantes para defesa imune do homem, especialmente ativando a produção de citocinas pró-inflamatórias (NETEA, VAN DER MEER, KULLBERG, 2004).

A ausência de ligação de PAMPs com TLRs resulta no aumento da susceptibilidade a parasitos, como para *Leishmania* sp. Isto foi demonstrado em estudos com camundongos C57BL/6 deficientes da proteína MyD88 do TLR que apresentaram-se mais suscetíveis à infecção por *L. major* que camundongos selvagens, revelando assim o importante papel da resposta imune inata do hospedeiro no reconhecimento e controle desta infecção (VEER *et al.*, 2003).

Após a inoculação das formas promastigotas na pele, a maioria destes patógenos são destruídos pela ação do sistema complemento. No entanto, algumas formas promastigotas metacíclicas são resistentes à ação lítica desse sistema. Já foi demonstrado que moléculas de lipofosfoglicano e glicoproteínas do parasito são utilizadas como barreira de proteção contra a lise pelo complemento (MOSSER *et al.*, 1986).

Os promastigotas metacíclicos infectantes que conseguem escapar da ação lítica do sistema complemento, dos eosinófilos e dos neutrófilos poderão ser internalizados por macrófagos e no interior destas células se transformarão em amastigotas dentro de vacúolos parasitóforos. Neste microambiente, os parasitos passam a multiplicar-se por divisão binária. A entrada dos parasitos nos macrófagos é uma etapa crítica para a infecção, sendo mediada por receptores da membrana do macrófago que se ligam às moléculas da membrana das formas promastigotas metacíclicas (CHANG, 1981).

Além dos macrófagos da derme, outras células com capacidade fagocítica, como a células de Langerhans (CL), exercem papel fundamental de vigilantes do território cutâneo fagocitando micro-organismos invasores. Após a fagocitose as CL migram para os linfonodos regionais a fim de realizar a apresentação antigênica aos

linfócitos, dando início ao desenvolvimento da imunidade específica (ROMANI *et al.*, 2003). Assim, a CL tem função crítica no processo de combate à LTA, já que é considerada a principal célula apresentadora de antígenos parasitários para os linfócitos T. Desse modo, as CL representam o veículo que promoverá o primeiro contato do antígeno com a resposta imune, resultando na estimulação diferenciada das subpopulações dos linfócitos T virgens para células Th1 ou Th2, com consequente produção de citocinas que irão regular positiva ou negativamente a atividade dos macrófagos resultando na eliminação ou não do parasito (MOLL, 1993).

As citocinas e quimiocinas exercem ação tanto na fase inata como na adaptativa e são muito importantes no processo de defesa do hospedeiro. Na leishmaniose, observa-se que a eliminação e/ou controle dos parasitos é verificada durante a estimulação de respostas imune do tipo Th1, acompanhada pela produção de citocinas como IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , envolvidas na ativação de macrófagos. Já na estimulação de resposta do tipo Th2, as citocinas produzidas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) podem inibir a ativação de macrófagos e então contribuir para a sobrevivência dos protozoários (SADICK *et al.*, 1991; SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002). Corroborando com os dados de que a resposta imune protetora na leishmaniose é a do tipo Th1, pesquisadores verificaram que camundongos BALB/c, suscetíveis à infecção com *L. major*, desenvolvem resposta imune Th2, enquanto que camundongos C57BL/6 desenvolvem resposta Th1 e assim controlam a infecção (STEBUT e UDEY, 2004). Clinicamente, na fase ativa da LTA, observa-se predominância sérica de linfócitos T CD4 com produção tanto de citocinas do tipo Th1 quanto do tipo Th2. Já em indivíduos com regressão espontânea da lesão ou naqueles que apresentam cura clínica após o tratamento quimioterápico, há maior produção de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-4 (COUTINHO *et al.*, 1998).

Em relação aos anticorpos é sabido que nas leishmanioses cutânea e mucocutânea, a imunidade celular e a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 têm sido associadas à resposta do tipo Th1; já o perfil Th2 tem sido relacionado com a leishmaniose cutânea-difusa, com presença de IgG4 (RODRIGUEZ, CENTENO e ULRICH 1996; SOUZA *et al.*, 2005). A intensidade da resposta humoral parece estar relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção. No entanto, podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO *et al.*, 1999).

Também há evidências de que as formas amastigotas do parasito, opsonizadas por IgG, podem ser fagocitadas via receptor Fc dos macrófagos. Essa ligação do patógeno com receptores dos macrófagos pode alterar o perfil de citocinas secretadas, prevenindo a produção de citocinas pro-inflamatórias (PLEASS e WOOF, 2001).

São conhecidos muitos fatores de virulência e patogenicidade de *Leishmania* spp. Estes fatores estão relacionados tanto na adesão como na fagocitose de promastigotas pelas células hospedeiras, na inibição de processos proteolíticos dos macrófagos, no escape da destruição extracelular, na penetração em células fagocíticas e na persistência dos parasitos no hospedeiro. Os fatores mais bem caracterizados são lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de superfície principal de 63 KDa (GP63). Durante a fase inicial da infecção, o LPG promove a sobrevivência intracelular de promastigotas, inativando, no interior do macrófago, a fusão do fagossomo com os lisossomos (DESJARDINS e DESCOTEAUX, 1997). Já se o fagolisossomo for formado, a GP63 assume uma função protetora, inibindo as enzimas fagolisossomais (SORENSEN, HEY e KHARAZMI 1994; KHARAZMI *et al.*, 1999; YAO *et al.*, 2003).

## 2.5 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

O diagnóstico das leishmanioses é baseado nas características clínicas, em critérios epidemiológicos e em resultados de testes de laboratório (GOTO e LINDOSO, 2010). No entanto, não há um método único que possa ser adotado como padrão ouro para o diagnóstico de infecções por *Leishmania* spp. (ANDRADE *et al.*, 2001; SZARGIKI *et al.*, 2009).

Durante a etapa laboratorial de diagnóstico, diversos métodos são aplicados para detectar o parasito e identificar as espécies de *Leishmania*. Os métodos diretos ou parasitológicos isolam o parasito a partir de úlceras na pele (para forma cutânea) ou a partir de medula óssea ou gânglios linfáticos (quando se trata de LV). O material pode ser examinado a fresco (sob um microscópio óptico) ou inoculado em meio de cultura para multiplicação do parasito. O sucesso no achado do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo raro após



um ano de infecção. Lesões muito contaminadas com bactérias ou fungos também contribuem para diminuir a sensibilidade do método. Recomenda-se a coleta do material após assepsia local com água e sabão. As espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e alguns dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. Estas características tornam o método de isolamento do parasito em culturas inadequado para o inquérito epidemiológico em larga escala (MONTENEGRO, 1926; FURTADO, 1980; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000).

A sensibilidade da cultura parasitológica nos casos produzidos por *L. braziliensis* está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses. A sensibilidade global do método está em torno de 50% para *L. braziliensis*. Os casos crônicos, como aqueles com baixa carga parasitária na lesão, resultam em uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método (MONTENEGRO, 1926; FURTADO, 1980; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000; LACHAUD *et al.*, 2000).

Outra possibilidade para o diagnóstico desta parasitose é o uso de técnicas moleculares que pesquisam fragmentos de DNA do parasito. O ensaio de PCR para *L. infantum* usando sangue periférico como amostra clínica mostrou ser uma alternativa altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, exibindo sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (NUZUM *et al.* 1995; LACHAUD *et al.*, 2000). No entanto, Fichoux e colaboradores (1999) indicaram que a parasitemia pode ser episódica podendo acarretar baixa quantidade de parasitos no sangue no momento da coleta e, conseqüentemente, não detecção pela PCR. Além disso, as técnicas moleculares necessitam de aparatos específicos e não são todos os laboratórios que possuem equipamentos de alta complexidade para realização destas análises.

O teste de hipersensibilidade tardia da pele (também chamado de Montenegro) é utilizado para forma cutânea. O teste é utilizado em larga escala no Novo Mund, pode detectar infecção em algumas semanas e avalia a imunidade celular. No entanto, é sabido que os testes que utilizam promastigotas ou proteínas solúveis do parasito como fonte de antígeno sensibilizador podem limitar a especificidade do teste e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas (MONTENEGRO, 1926; GONTIJO e MELO, 2004).

Os exames de sangue que detectam anticorpos (resposta imune humoral) também são úteis. Muitos estudos foram realizados no sentido de avaliar métodos de diagnóstico para LTA. Essas pesquisas enfatizaram a necessidade de associação de duas ou mais técnicas indiretas para o diagnóstico da referida parasitose para a realização de um diagnóstico preciso (FABER *et al.*, 2003; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; SZARGIKI *et al.*, 2009).

O teste de ensaio imuno-enzimático (ELISA) para diagnóstico da leishmaniose é considerado um teste rápido, sensível para detecção de anticorpos e facilmente automatizável. No entanto, não está disponível para comercialização no Brasil. Estudos visando o aprimoramento desta metodologia e empregando antígenos purificados vêm sendo desenvolvidos para que se possa obter uma forma rápida, segura e eficaz o diagnóstico dessa doença (PORROZZI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012; FUMAGALLI *et al.*, 2013).

## 2.6 PHAGE DISPLAY NA SELEÇÃO DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE

O desenvolvimento de novas biomoléculas com o objetivo de se obter fármacos, vacinas e outros produtos de interesse biotecnológico atrai diversos grupos de pesquisadores (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

Buscando fornecer informações sobre fatores de virulência, enzimas críticas, caminhos metabólicos e candidatos a vacinas para a leishmaniose, o genoma de *L. major* (IVENS *et al.*, 2005) foi analisado por um grupo de pesquisadores. Já outro consórcio de cientistas comparou a sequência genética, já conhecida, de *L. major* com o de *L. infantum* e *L. braziliensis*. Os resultados mostram que há apenas 200 genes diferentes em um universo de mais de 8 mil presentes no genoma de cada uma das espécies. Acredita-se que esses poucos genes diferenciados sejam responsáveis pelas variações da doença. Os genes que são distribuídos diferentemente entre as espécies codificam proteínas envolvidas nas interações patógeno-hospedeiro e sobrevivência do parasita no macrófago (PEACOCK *et al.*, 2007).

A partir da sequência de genes específicos em cada espécie, abre-se a possibilidade do desenvolvimento de novos tratamentos, visto que o estudo das proteínas codificadas por essas sequências de DNA poderia levar ao desenvolvimento de drogas, vacinas e novos testes de diagnóstico para essa doença (PEACOCK *et al.*, 2007).

As proteínas são formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas e constituem as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, cujas funções são cruciais em todos os processos biológicos. Desde o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, nos anos de 1980, é crescente o número de novas moléculas de origem biotecnológica estudadas, como proteínas e peptídeos recombinantes, anticorpos monoclonais e ácidos nucleicos que apresentam um alto potencial terapêutico e profilático (BREEDVELD, 2000; FRANCO *et al.*, 2008; NELSON E COX, 2011).

*Phage display* é uma técnica de seleção de peptídeos *in vitro* na qual uma proteína ou peptídeo é geneticamente fundido a proteínas de superfície de um bacteriófago filamentosos, resultando na expressão de uma proteína heteróloga na superfície do capsídeo viral. A inserção de sequências de nucleotídeos nos fagos é feita em uma região pré-determinada do genoma viral e permite a construção de uma biblioteca conformacional (SMITH, 1985).

Os fagos filamentosos (M13, f1, fd, entre outros) pertencem à família Inoviridae de bacteriófagos e possuem como material genético DNA fita simples (ssDNA). A infecção viral ocorre via pilus sexual de células bacterianas Gram-negativas que apresentam o gene desta fímbria especial codificado pelo plasmídeo F. A liberação das partículas virais, que são produzidas a cada ciclo, se realiza a partir da extrusão do DNA através da membrana. Em nenhum destes dois processos ocorre lise celular. A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de fagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, abriu o caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície dessas partículas virais. Sendo assim, fagos que exibem um ligante relevante são retidos em virtude de sua ligação com o alvo, enquanto que os fagos não-aderentes são lavados e descartados. Esse processo de seleção é feito artificialmente e denominado *biopanning*, no qual a molécula alvo é imobilizada em um suporte sólido, geralmente uma placa de ELISA. Uma síntese

das etapas realizadas durante esta técnica é demonstrada na FIGURA 3 (BENHAR, 2001; BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

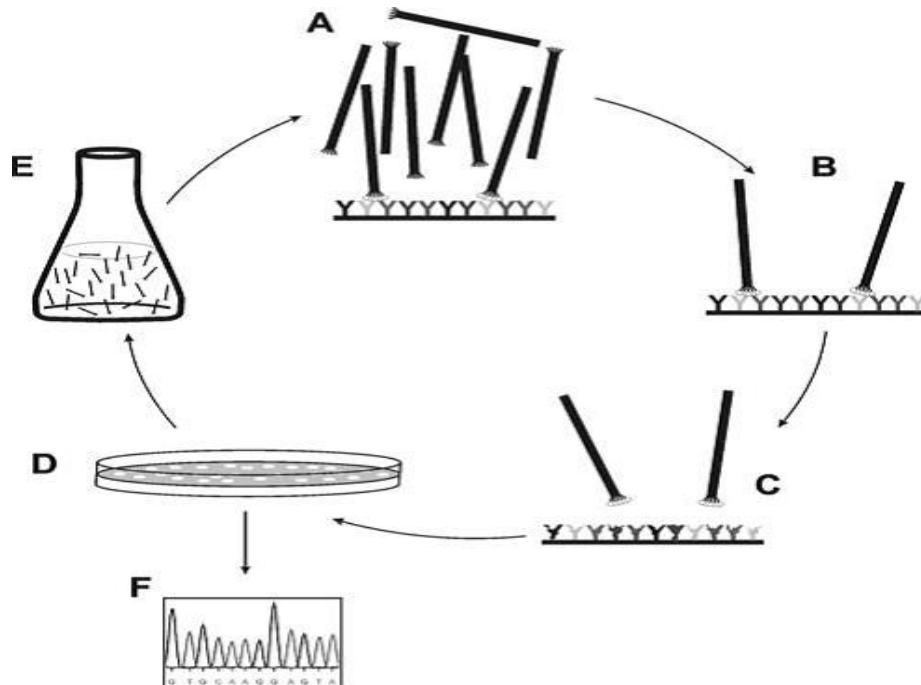


FIGURA 3 - PRINCÍPIO BÁSICO DO RASTREAMENTO DE FAGOS DE INTERESSE. (A) A biblioteca de fagos é incubada com um alvo immobilizado. (B e C) Fagos não ligados são removidos por lavagem enquanto fagos ligantes são eluídos. (D e E) Fagos são cultivados em bactérias, amplificados em meio líquido de crescimento e submetidos a novos ciclos de amplificação. (F) A proteína expressa na superfície dos fagos é obtida após extração e sequenciamento de DNA dos bacteriófagos isolados. Fonte: Adaptado de BRATKOVIC, 2010.

Outra característica importante é que essa metodologia utiliza os mais rápidos protocolos de seleção já descritos, uma vez que o sobrenadante das culturas infectadas pode ser utilizado diretamente para a seleção. Esta utilização dispensa a transferência para membranas que, além de limitar o número de clones, é um processo extremamente trabalhoso (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

No Brasil, foi avaliada a eficácia protetora contra a leishmaniose experimental pela imunização com dois peptídeos sintéticos selecionados pelas técnicas de *Phage display* e *Spot synthesis* em camundongos desafiados com *L. amazonensis*. A imunização foi capaz de induzir elevada resposta imune Th1 antes da infecção.

Após o desafio, uma produção elevada de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-4, IL-10 e anticorpos específicos ao parasita foram observados nestes animais ao contrário do que observado nos animais controle. Esses peptídeos demonstraram ser candidatos à vacina contra a leishmaniose tegumentar americana (FUMAGALLI, 2008).

Em relação a *L. braziliensis*, não existem relatos na literatura de seleção de peptídeos utilizando a técnica de *Phage display*. Essa investigação é importante para atender a demanda de insumos diagnósticos para detecção de *L. braziliensis* e assim auxiliar no tratamento precoce de indivíduos acometidos pelo parasito.

Como a leishmaniose afeta principalmente os países subdesenvolvidos, a investigação e desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, tratamento e profilaxia têm sido drasticamente negligenciadas. Há uma clara necessidade de mais investimentos em pesquisa para avançar e melhorar a conduta destes casos (DESJEUX, 2004).

São apresentados estudos sobre testes diagnósticos por ELISA para leishmaniose na TABELA 2, relacionando autores, ano, sensibilidade e especificidades obtidas, forma clínica analisada, método para obtenção de antígenos e algumas observações.

Após o diagnóstico da doença, estabelece-se o tratamento com antimoniais. Todavia, esta terapia possui alguns inconvenientes como efeitos colaterais e limitações a pacientes contra-indicados, além de resistência do parasita ao fármaco. Quando não há êxito no tratamento com o antimonial utiliza-se a anfotericina B e a pentamidina. Além da quimioterapia, a associação com a imunoterapia (vacina) vem apresentando excelentes resultados e demonstrando grande eficiência (MAYRINK *et al.*, 2006).

TABELA 2 - TRABALHOS QUE BUSCARAM DESENVOLVER TESTES ELISA INDIRETO PARA LEISHMANIOSE RELACIONANDO AUTORES, ANO, SENSIBILIDADES E ESPECIFICIDADES OBTIDAS, FORMA CLÍNICA, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS E OBSERVAÇÕES.

<b>Autores/ano</b>	<b>Sensibilidade e especificidade</b>	<b>Formas clínicas</b>	<b>Método de obtenção dos antígenos</b>	<b>Observações</b>
FARGEAS <i>et al.</i> , 1996	71 e 93%	LV	Clonagem	79 (sens) e 80% (espec) com AS
PASSOS <i>et al.</i> , 2005	100% e 100%	LV	Clonagem	Antígenos KPM11
PORROZZI <i>et al.</i> , 2007	70 a 100% e 98%	Canina	Clonagem	Sensibilidade com AS 88%
OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011	Sens. 64 a 93% (canina) e 36 a 97% (LV) e espec. 76 a 100% (canina) e 90 a 97% (LV)	LV e canina	Clonagem	.
FARIA <i>et al.</i> , 2011	88 e 95%	Canina	Predição de epítipo de célula B	Comparou com kit EIE - Biomanguinhos (13% de sens. e 100% espec.) – imunocromatografia
KUMAR <i>et al.</i> , 2012	95 e 100%	LV	SDS PAGE e 2D	-
COSTA <i>et al.</i> , 2012	71 a 100 % (canina) e 81 a 100% (LV)	LV e canina	Predição de epítipo de célula B	<i>Cut-off</i> variaram de 0,143 a 0,441
FUMAGALLI <i>et al.</i> , 2013	75% e 90%	Canina	Predição de epítipo de célula B	

Nota: Sens.: sensibilidade, Espec.: especificidade, AS: Antígeno solúvel, LV: leishmaniose visceral

## 2.7 IMUNOPROFILAXIA DA LEISHMANIOSE

Considerando a multiplicidade de fatores que envolvem a transmissão da leishmaniose, nota-se a dificuldade para se formular estratégias eficientes para o controle dessa doença. Neste sentido, progressos ocorrem nos estudos de novos antígenos candidatos a vacinas contra a leishmaniose, visto que a imunoprofilaxia é reconhecida mundialmente por ser uma forma segura e eficaz de levar o sistema imunológico a desenvolver defesa contra determinados agentes patogênicos.

O desenvolvimento de novas vacinas, iniciado com imunizações contra a varíola em 1796 por Edward Jenner, busca a estimulação da resposta imunológica dos organismos frente a patógenos e assim torna-se uma importante ferramenta no combate às doenças infecciosas (HANDMAN *et al.*, 1997).

As vacinas de primeira geração representam aquelas que empregam na sua composição o agente patogênico morto ou submetido a tratamentos que levam à sua inativação ou à atenuação. As composições que incluem parasitos mortos abrem a possibilidade de promover proteção utilizando o micro-organismo por inteiro e contendo muitos antígenos, já as que apresentam organismos atenuados tem a vantagem de não necessitar de doses de reforços, visto que os parasitos, apesar de terem perdido sua capacidade de produzir a doença, encontram-se vivos e podem se multiplicar e ativar o sistema imune do hospedeiro. No entanto, uma preocupação ao se utilizar vacinas com agentes atenuados é a possibilidade de reversão da virulência e o aparecimento da doença em um indivíduo vacinado. A padronização das cepas de uma cultura para outra é um dos principais entraves que impede o registro e comercialização de vacinas mortas (OKWOR *et al.*, 2012).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular começaram a surgir os primeiros candidatos vacinais constituídos por subunidades definidas, denominados antígenos recombinantes que marcariam a segunda geração de vacinas. Estas pesquisas permitiram o desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. No final dos anos 90, com o avanço dos estudos do genoma de diferentes agentes infecciosos, começaram a surgir vacinas de terceira geração (chamadas vacinas de DNA), constituídas de genes que codificariam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos, as quais teriam

uma aplicação promissora no controle de diversas infecções (XU e LIEW,1994; ULMER *et al.*, 1996; HANDMAN *et al.*, 1997).

Uma vacina ideal contra a leishmaniose deve ter várias propriedades, incluindo ser segura, necessitar de um número pequeno de imunizações, induzir proteção a longo prazo contra a maioria ou todas as espécies que causam leishmaniose no homem, ser biologicamente estável e de fácil administração, ser economicamente acessível, viável e também ser eficaz tanto no tratamento como na prevenção da leishmaniose. Ainda, durante o desenvolvimento de tal vacina é essencial caracterizar antígenos protetores e implantá-los em sistemas criativos e otimizados para atender os padrões científicos e a regulamentação vigente (WAHREN e BRYTTING, 1997; COLER e REED, 2005).

Existem relatos de que a vacinação contra a leishmaniose humana tem sido praticada há séculos. No entanto, os primeiros estudos vacinais publicados foram realizados nos países asiáticos, onde foram inoculadas cepas vivas virulentas de *L. major* na população, prática conhecida como leishmanização, cujo objetivo seria a atingir imunidade duradoura após a cura da lesão, o que foi eficaz na leishmaniose cutânea no Velho Mundo. Nas inoculações efetuadas em pessoas observou-se o aparecimento de lesões menores seguidas de recuperação dos pacientes. No entanto, vários problemas impedem o uso generalizado deste procedimento, incluindo a parte logística, dificuldade de padronização de virulência das cepas e ocasionais lesões persistentes graves, resultantes da inoculação da vacina (NADIM, 1984; KHAMESIPOUR *et al.*, 2005).

Muitas das vacinas testadas atualmente utilizam parasitos mortos (vacinas de primeira geração). Os primeiros ensaios clínicos de imunização com promastigotas de *Leishmania* mortos contra leishmaniose no Brasil são datadas de 1939, quando Salles-Gomes e Pessoa imunizaram determinada população com este tipo de preparação. Os resultados sugeriram um efeito protetor do esquema vacinal com diminuição do tamanho das lesões nos indivíduos imunizados. Estimulados com os resultados, novos testes contra a LTA em humanos foram desenvolvidos. Uma suspensão de formas promastigotas dermotrópicas de *Leishmania* sp. preparadas em solução fenolada foi administrada intramuscularmente em voluntários. Após 20 meses de observação encontrou-se nos indivíduos controle negativos um índice de desenvolvimento da doença da ordem de 18%, enquanto que entre os vacinados somente 3,2% adoeceram (PESSOA, 1941).



Os estudos de Pessoa e colaboradores foram seguidos muito mais tarde por uma série de ensaios realizados por Mayrink e colaboradores (1979). Algumas modificações foram introduzidas no protocolo de vacinação (incluindo a diminuição do número de cepas de *Leishmania*) e também na preparação da suspensão. Desta forma, apenas cinco cepas dermatrópicas (isoladas de diferentes áreas no Brasil) foram usadas, a sonicação dos parasitos foi também introduzida e o teor de nitrogênio total foi usado como uma forma de normalizar as preparações.

O grupo de Mayrink e colaboradores utilizaram esta vacina em militares da Amazônia (área de alto risco para leishmaniose). Observou-se redução de 67,3% em 1980 e 7% em 1983 na incidência da doença entre os indivíduos vacinados que passaram a apresentar Teste de Montenegro (IDR) positivo. Também foi sugerido que o teste intradérmico (IDR), em humanos, seria um importante indicador da resposta imune o que, de certa forma, refletiria um estágio de proteção. Nenhum efeito de exacerbação da doença foi observado (ANTUNES *et al.*, 1986).

O estudo do grupo de pesquisa supra citado também revelou que a vacinação aumenta a proliferação de linfócitos e a respostas de células mononucleares do sangue periférico, quando em comparação com os indivíduos controles não vacinados. Observaram também correlação de 90% destes resultados com o teste cutâneo positivo. Os ensaios demonstraram que o soro de indivíduos vacinados reconheceu oito principais antígenos com massas moleculares estimadas em 13,5, 25, 40, 63, 73, 85, 97 e 160 kDa (NASCIMENTO *et al.*, 1990).

Em 1985, resultados de uma campanha de vacinação durante epidemia de LTA na cidade de Viana no Espírito Santo revelaram diferenças estatisticamente significantes nos níveis de infecção entre os grupos vacinados e não vacinados, com 87,6% dos indivíduos vacinados apresentando Teste de Montenegro positivo após a vacinação (MAYRINK *et al.*, 1985). Apesar dos ótimos resultados obtidos com a campanha, críticas foram feitas quanto à sua composição e identificação das cepas que compunham a suspensão vacinal, já que as várias cepas de *Leishmania* não eram bem caracterizadas, o que levavam a dificuldades de fabricação e padronização da vacina.

Reuniões científicas foram organizadas para analisar a estratégia vacinal adequada para pesquisas e a formulação da vacina utilizando somente uma cepa de *L. amazonensis*. Também foi decidido que a Biobrás SA (indústria farmacêutica interessada na produção e comercialização do produto) produziria a vacina incluindo

no processo as boas práticas de fabricação. Ensaios de Fase I foram realizados no Rio de Janeiro. De acordo com avaliações clínicas e laboratoriais realizadas, apesar da alta concentração de proteína total por imunização, concluiu-se que a vacina era inócua se aplicada, e ensaios de Fase II foram iniciados (MARZOCHI *et al.*, 1995). Esta vacina foi testada com o uso de adjuvantes em 56 voluntários saudáveis que receberam vacina e placebo ou rhGM-CSF (Fator recombinante humano estimulante colônias de granulócitos macrófagos). Os níveis de IFN-gama e IL-5 foram significativamente aumentados no grupo que recebeu a vacina. O grupo que recebeu apenas adjuvante teve resposta significativa à vacinação, comparado ao grupo placebo (86% de todos os voluntários foram IDR positivo no dia 42). A utilização de rhGM-CSF melhorou a resposta imune indicando que ele poderia otimizar a resposta imunológica à vacina (FOLLADOR *et al.*, 2002). Apesar de todos os esforços ainda não existe uma vacina para leishmaniose humana em utilização.

O uso de organismos atenuados ou produtos parasitários é uma abordagem que visa evitar os perigos e as inconveniências do emprego de parasitos infectantes. Em relação aos imunobiológicos da segunda geração, protocolos vêm sendo desenvolvidos e/ou testados em diversos países, mas até o presente, nenhum foi comprovado ser satisfatoriamente eficaz ou viável (VÉLEZ *et al.*, 2010; FUMAGALLI *et al.*, 2013)

Considerando o exposto, fica evidente a necessidade de produção de antígenos purificados, de alta sensibilidade e segurança para a prevenção da leishmaniose. Dentre as vacinas de segunda geração testadas para leishmaniose algumas são apresentadas na TABELA 3.

**TABELA 3 – VACINAS DE SEGUNDA GERAÇÃO TESTADAS PARA LEISHMANIOSE, RELACIONANDO AUTORES, ANO, ANTÍGENOS, MÉTODOS PARA OBTENÇÃO, MODELO EXPERIMENTAL/CEPA, CEPA TESTADA, RESULTADOS E ALGUMAS OBSERVAÇÕES**

<b>Autores/ano</b>	<b>Antígenos e métodos para obtenção</b>	<b>Modelos experimental/cepa</b>	<b>Resultados obtidos</b>	<b>Observações</b>
SPITZER <i>et al.</i> , 1999	GP63 - Clonagem	Camundongos Balb/c - <i>L. major</i>	Proteção (ausência lesões) por dez meses após o desafio	

<b>Autores/ano</b>	<b>Antígenos e métodos para obtenção</b>	<b>Modelos experimental/cepa</b>	<b>Resultados obtidos</b>	<b>Observações</b>
COELHO <i>et al.</i> , 2003	LACK e A2 - Clonagem	Camundongos Balb/c - <i>L. donovani</i>	Proteção. RI Th1 (altos níveis de IFN- $\gamma$ e baixos de IL-4), anticorpos específicos e diminuição na quantificação parasitária	Foi observada proteção somente com A2 e não com LACK quando o desafio foi realizado com cepas de <i>L. amazonensis</i>
SALAY <i>et al.</i> , 2007	Clonagem de 4 diferentes proteínas	Camundongos Bab/c - <i>L. braziliensis</i>	Ausência de proteção. Não foi observada diminuição no tamanho ou número de lesões características. Ausência IFN- $\gamma$	Proteínas: Receptor homólogo de C quinase, Antioxidante thiol-específica, Fator de iniciação e alongamento de <i>Leishmania</i> e Fator de indução de estresse de <i>L. major</i>
FUMAGALLI, 2008	Peptídeos sintéticos - Técnica de <i>Phage Display</i>	Camundongos Bab/c - <i>L. amazonensis</i>	Proteção. Elevada RI Th1 antes da infecção. Produção elevada de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-4, IL-10 e anticorpos específicos para o parasito nos animais vacinados	
VÉLEZ <i>et al.</i> , 2010	Clonagem de 3 proteínas	Humanos – sem desafio	Proteção. IFN- $\gamma$ foi maior nos vacinados. Títulos de IgG específicos foram observados. Teste IDR foi positivo em todos os participantes que receberam o imunógeno	Proteínas clonadas: (Antioxidante thiol-específica, Fator de iniciação e alongamento de <i>Leishmania</i> e Fator de indução de estresse de <i>L. major</i>

Nota: RI: Resposta imune, LACK: *Leishmania homologue of receptors for activated C kinase*.

Apesar da existência de inúmeros estudos visando a profilaxia da leishmaniose humana, muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas. As medidas de controle da LTA até agora implementadas foram incapazes de eliminar ou diminuir a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias. Já os métodos disponíveis para o diagnóstico e as pesquisas visando imunoprofilaxia da LTA ainda não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas, embora avanços promissores tenham sido alcançados com as pesquisas de novos testes.

## 2.8 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

O tratamento de primeira escolha para leishmaniose tegumentar americana é o antimonial pentavalente. Embora este tratamento seja na maioria das vezes efetivo e indicado, devem ser consideradas as desvantagens tais como efeitos colaterais, longa duração do tratamento e contra-indicação para cardiopatas, nefropatas, idosos e grávidas (MAYRINK *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos buscando vacinas para o tratamento de LTA são datados do início do século, quando foram cultivadas e esterilizadas cepas de *Leishmania tropica* (originárias de infecções experimentais de macacos) que compuseram uma vacina aplicada em indivíduos com lesões características de LTA. A análise dos resultados demonstrou que o tratamento foi bem sucedido, pois proporcionou a cura dos casos (ROW, 1912).

Um protocolo para imunoterapia foi testado por Mayrink e colaboradores administrado-se a indivíduos com LTA doses crescentes a uma vacina composta por promastigotas mortos. Séries de 10 dias de tratamento, foram aplicadas até se observar a cura completa dos indivíduos. Dos 122 pacientes participantes, 60 receberam a vacina e os demais foram tratados com a quimioterapia convencional. Os resultados deste ensaio confirmam que 95% dos pacientes tratados com a vacina foram curados após um máximo de 20 séries (400 dias). Mais uma vez, a imunoterapia provou ser uma alternativa de tratamento eficaz para a LTA, especialmente quando a quimioterapia convencional não é recomendada (MAYRINK 1991,1992).

Mais recentemente demonstrou-se que a associação do antimônio com a vacina (imunoquimioterapia) apresentou alto índice de cura (100%). Também verificou-se que a aplicação da vacina reduziu o volume do sal em 17,9% e o tempo de cura de 87 para 62 dias; conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais (MAYRINK *et al.*, 2006).

Deve ser considerado ainda o uso de vacina anti-*Leishmania* em pacientes que apresentam co-morbidades. A ocorrência de leishmaniose em pacientes com HIV ou hanseníase tem aumentado, sendo que estes pacientes são geralmente resistentes à quimioterapia convencional e apresentam maus prognósticos na maioria dos casos. Pacientes HIV positivos e com LTA foram tratados com imunoterápicos e em todos os casos de regressão da lesão foi alcançado com êxito (HERMETO *et al.*, 1992, CUNHA *et al.*, 1994). Já em pacientes com associação de LTA e hanseníase (formas virchowiana e indeterminada) três doses de vacina combinada com BCG em um período de três meses foram necessários para induzir a cura completa das lesões (SILVEIRA e MAYRINK, 1997).

O arsenal terapêutico da LTA é muito restrito já que as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade e nenhuma delas é eficaz. A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal. Neste sentido é desejável a realização de pesquisas que visem à cura da doença de forma mais rápida e com poucos efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. S. R. *et al.* Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 78, n. 3, p. 261-262, mar. 2001.

ANTUNES, C. M. F. *et al.* Controlled field trials of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis. **The International Journal of Epidemiology**, v.15, n.4, p. 572-580, dec.1986.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 1, p. 1-33, feb. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2010.

BRATKOVIC, T. Progress in Phage display: evolution of the technique and its applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 5, p. 749-767, mar. 2010.

BREEDVELD, F. C. Therapeutic monoclonal antibodies. **The Lancet**. v. 355, n. 9205, p. 735-740, feb. 2000.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 26, p. 44-51, 2002.

CHANG, K, P. *Leishmania donovani* macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 4, n.1 e 2, p. 67-76, nov. 1981.

COELHO, E. A. F. *et al.* Immune responses induced by *Leishmania (Leishmania) donovani* A2, but not by LACK antigen, are protective against experimental *L. (L.) amazonensis* infection. **Infection Immunology**, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, jul. 2003.

CASTRO, E. A. *et al.* Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 445-452, oct. 2002.

CASTRO, E. A. *et al.* Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, p. 141-149, feb. 2005.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244-249, may. 2005.

CUNHA, R. M. C. *et al.* leishmaniose disseminada em paciente infectado pelo vírus HIV. Evolução clínico-morfológica atípica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 1, p. 389, 1994.

COSTA, M. M. *et al.* Improved Canine and Human visceral Leishmaniasis Immunodiagnosis Using Combinations of Synthetic Peptides in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1622, may. 2012.

COUTINHO, S. G. *et al.* Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **The Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 139-142, jan. 1998.

DEDET, J. P. Leishmaniasis: a growing problem due to environmental changes and human behaviors. **Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine**, v. 191, n. 8, p. 1579-1587, nov. 2007.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **The Journal of experimental Medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061-2068, jun. 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, sept. 2004.

DIAS, E. S. *et al.* Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, v. 49-52, feb. 2007.

FABER, W. R. *et al.* Value diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, n. 49, p. 70-74, jul. 2003.

FARGEAS, C. *et al.* Synthetic Peptide-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 241-248, feb. 1996.

FARIA, A. L. *et al.* High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p.1310, sept. 2011.

FICHOUX, Y. L. *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, jun. 1999.

FOLLADOR, I. *et al.* Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine**, v. 31, p. 1365-1368, jan. 2002.

FRANCO, L. H. *et al.* A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 6, p. 3, jan. 2008.

FUMAGALLI, M. A. C. *et al.* Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 835-841, jun. 2013.

FUMAGALLI, M. A. C. **Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *Phage display* e *spot synthesis***. 85 f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Controle da leishmaniose tegumentar americana**, Brasília, 2000.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de LTA. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 65, p. 51-86, sept. 1980.

GAUCI, C. *et al.* Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis by immunization with novel recombinant antigens. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3824-3828, jun. 2012.



GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 1, p. 71-80, jan-fev, 2003.

GONTIJO, C. M. F. e MELO, M. N. leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7 n. 3, p. 338 – 349, sep. 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, apr. 2010.

GRIMALDI, G. R.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230-250, jul. 1993.

GUERMONPREZ, P. *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 621-667, oct. 2002.

HAMBY P. G. *et al.* Use of peptide library screening to detect a previously unknown linear diagnostic epitope: Proof of Principle by Use of Lyme Disease Sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 7, p. 801–807, jul. 2005.

HANDMAN, E. *et al.* Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4261-4267, nov. 1997.

HERMETO, M. V., *et al.* Antimony- resistant American Cutaneous Leishmaniasis treated with immunotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 87, n.1, p.187, 1992.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v.15, p. 436-442, 2005.

KHAMESIPOUR, A. *et al.* Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3642-3248, may 2005.

KHARAZMI, A. *et al.* T-cell response in human leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 65, n. 1-2, p.105-108, jan.1999.

KUMAR, S. *et al.* Identification and Characterization of a Novel *Leishmania donovani* Antigen for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 601-605, apr. 2012.

LACHAUD, L. *et al.* Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 1, p. 236-240, jan. 2000.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569-596. 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, jan. 2005.

LIPOLDOVA, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 4, p. 294-305, apr. 2006.

LUZ, E. *et al.* *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, p.623-631, 2000.

MARQUES-DA-SILVA, E. A. *et al.* Intramuscular immunization with P-36 (LACK) DNA vaccine induces a type 1 response but do not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitology Research**, v. 98, n. 1, p. 67-74, nov. 2005.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 187-198, sept. 1985.

MARZOCHI, K. B. F. *et al.* Phase I studies for the Leishvacin (Killed Leishmamx vaccine) in Brazil. Workshop on vaccine efficacy trial against Leishmaniasis, 1995.

MAYRINK, W. *et al.* An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 3 p. 259-269. jun. 1985.

MAYRINK, W. *et al.* Tratamento da leishmaniose tegumentar americana utilizando vacina. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 66, p. 55-59, 1991.

MAYRINK, W. *et al.* Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: Preliminary studies in Brazil. *Parassitologia (Rome)*, v. 34, p. 15965, 1992.

MAYRINK, W. *et al.* Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, feb. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Técnico Institucional. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 200-202, 2010.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**, v. 14, n. 8 p. 383-387, aug. 1993.

MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives of dermatology and syphilology**, v. 13, p. 187, 1926.

MOSSER, D. M. *et al.* *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. **experimental Parasitology**, v. 62, n. 3, p. 394-404, dec. 1986.

NADIM, A. Immunity to Cutaneous Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 848, 1984.

NASCIMENTO, E. *et al.* Vaccination of Humans against Cutaneous Leishmaniasis: Cellular and Humoral Immune Responses. **Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2198-2203, jul. 1990.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5º edição. São Paulo: Sarvier, 2011.

NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 484-488, nov. 2004.

NUZUM, E. *et al.* Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 3, p. 751-754, mar. 1995.

OKWOR, I. *et al.* Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Frontiers Immunology**, v. 29, n. 3, p. 128, may 2012.

OLIVEIRA, S. G. G. *et al.* Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, dec. 2011.

PASSOS, S. *et al.* Recombinant *Leishmania* Antigens for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 10, p. 1164-1167, oct. 2005.

PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetetics**, v. 39, n. 7, p. 839-847, jun. 2007.

PESSOA, S. B, PESTANA, B. R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. **Revista de Biologia e Higiene**, v. 10, p. 112-118, 1941.

PLEASS, R. J, WOOF, J. M. Fc receptors and immunity to parasites. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 11, p. 545-551, nov. 2001.

PORROZZI, R. *et al.* Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* visceral Infections in Dogs. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, may 2007.

RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; ULRICH, M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 7, p. 341-345, jul. 1996.

ROMANI, N. *et al.* Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. **Acta pathologica, microbiologica, immunologica Scandinavica**, v. 11, n. 7-8, p. 1725-1740, aug. 2003.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **British Medical Journal**, v. 11, p. 1401, 1903.

ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 693-708, 1994.

ROUGERON, V. *et al.* Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask) in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. **Plos Pathogens**, v.6, n. 8, p.1-5, aug. 2010.

ROW, R. Curative value of *Leishmania* culture vaccine in Oriental sore. **British medical journal**, v. 9, p. 540-541, 1912.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, nov. 2002.

SADICK, M. D. *et al.* Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infection and Immunity**, v. 59, v. 12, p. 4710-4714, dec. 1991.

SALAY, G. *et al.* Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1173-1181, sep. 2007.

SARAVIA, N. G. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 4, p. 714-720, jul. 1985.

SCOTT, P.; KAYE, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 604-615, jul. 2011.

SHARMA, A. *et al.* Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 10, p. 1143-1154, oct. 2006.

SILVEIRA, F. T., MAYRINK, W. leishmaniose cutânea anérgica difusa no Estado do Pará, Brasil: Relato da cura de um caso depois de 24 anos de doença, após tratamento combinado de quimioterapia com imunoterapia. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG, Brasil, pôster 42, p.129, 1997.

SILVEIRA, T. G, *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, p.141- 147, apr. 1996.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, jun. 1985.

SOMPURAM, S. R. *et al.* Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 410-420, mar. 2002.

SORENSEN, A.L.; HEY, A.S.; KHARAZMI, A. *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. **Acta Pathologica, Microbiologica, Immunologica Scandinavica**, v. 102, n.4, p. 265-271, apr.1994.

SOUZA, M. A. *et al.* Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 137-141, apr. 2005.

SPITZER, N. *et al.* Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. **Vaccine**, v. 17, n. 11, p. 1298-1300, mar. 1999.

STEBUT, V.; UDEY, M. C. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. **Microbes and infection**, v. 6, n. 12, p. 1102-1109, oct. 2004.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, feb. 2009.

TEODORO, U, *et al.* Informações preliminares sobre flebotomíneos do norte do Paraná. **Revista de Saúde Pública**. v. 40, n. 2, p. 327-30, 2006.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 68, n. 2, p. 107-108, 1993.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 308-315. sep. 2009.

TROUILLER, P. *et al.* Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188 - 2194, jun. 2002.

TRUJILLO, C. . *et al.* The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence og IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology Letters**, v. 70, n. 3, p. 203-209, dec. 1999.

ULMER, J. B. *et al.* Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells; antigen presentation by non-muscle cells. **Immunology**, v. 89, n.1, p. 59-67, sep. 1996.

VEER, M. J. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 33, n.10, p. 2822–2831, oct. 2003.

VELEZ, I. D. *et al.* Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 329-337, dec. 2010.

WAHREN, B.; BRYTTING, M. DNA increases the potency of vaccination against infectious diseases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 2, p. 183-189, aug. 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) Disponível em:  
[http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis\\_epidemiology\\_access\\_to\\_medicine/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicine/en/index.html). Acesso em 12/02/2013.

XU, D.; LIEW, F. Y. Genetic vaccination against Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 12, n. 16, p. 1534-1536, dec. 1994.

YAO, C. *et al.* The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16, nov. 2003.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Identificar, por meio da técnica de *Phage display*, mimotopos ou epítomos específicos para anticorpos de pacientes com LTA que, após a síntese química, possam ser empregados no diagnóstico e imunoprofilaxia da leishmaniose tegumentar americana.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar mimotopos ou epítomos a partir de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos através da técnica de *Phage display* utilizando soros de pacientes com LTA;
- Identificar as sequências peptídicas específicas selecionadas pela técnica de *Phage display*;
- Sintetizar quimicamente as sequências peptídicas específicas selecionadas;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis quanto à possível utilização em ensaios sorológicos para diagnóstico da LTA;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis quanto ao estímulo da resposta imune celular e humoral em animais experimentais, visando sua utilização como vacina.

## CAPÍTULO 1

### *Phage display para seleção de antígenos de Leishmania braziliensis*

#### RESUMO

A técnica de *Phage display* foi aplicada para rastrear peptídeos a serem utilizados como antígenos em imunodiagnóstico e imunoprofilaxia de leishmaniose tegumentar americana (LTA). Os soros de 57 pacientes com teste imunoenzimático (ELISA) positivo para LTA tiveram suas imunoglobulinas G anti-*Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) purificadas e incubadas com bibliotecas de fagos. A afinidade do peptídeo expresso na superfície dos fagos com as imunoglobulinas específicas purificadas possibilitou a seleção de 428 clones de fagos. Os clones foram testados contra anticorpos de pacientes com LTA por ELISA sendo que 36 foram reativos e tiveram seus DNAs extraídos e sequenciados. Três peptídeos foram identificados e sintetizados quimicamente usando a estratégia 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) de fase sólida. A análise de similaridade em bancos de dados demonstrou que as sequências dos três peptídeos apresentam homologia com glicoproteína de 63 kDa, com Lipofosfoglicano e com proteínas hipotéticas de *Leishmania* sp. Os peptídeos 1, 2, 3 e um MIX dessas macromoléculas foram emulsionados em adjuvante completo e, posteriormente, em incompleto de *Freund* e injetados por via subcutânea em hamsters *golden*. Anticorpos anti-peptídeos obtidos foram reativos ao Antígeno solúvel (AS) de *L. braziliensis*, em avaliação *in vitro* por *Western blotting*. Soro dos hamsters que receberam o peptídeo 1 apresentaram anticorpos que reconheceram bandas proteicas entre 76 e 150 kDa de *L. braziliensis*. Já o soro dos animais que receberam peptídeos 2 e 3 apresentaram anticorpos que reconheceram bandas entre 52 e 76 kDa de *L. braziliensis*, assim como o MIX dos peptídeos. Esses resultados evidenciam um novo caminho para a busca de moléculas com fins terapêuticos, imunoprofiláticos, para diagnóstico e pesquisa em leishmaniose.

Palavras-chave: leishmaniose. Síntese química. Antígeno. Imunodiagnóstico. Peptídeos sintéticos.

## CHAPTER 1

### Phage Display to select *Leishmania braziliensis* antigens

#### ABSTRACT

Phage display technique was applied to screen peptides to be used as antigens in immunodiagnosis and immunoprophylaxis of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). Sera from 57 patients with positive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for ACL had their Immunoglobulin G anti-*Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) purified and incubated with phages libraries. The affinity of the peptide expressed on the surface of the phages with the specific purified immunoglobulins allowed the selection of 428 phage clones. The clones were tested against antibodies from patients with ACL by ELISA, 36 were reactive and had their DNA extracted and sequenced. Three peptides were identified and chemically synthesized using the 9- fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase (Fmoc). The similarity analysis of the peptides with sequence databases showed that they have similarity with a 63 kDa glycoprotein of *Leishmania*, a lipophosphoglycan and other hypothetical proteins of *Leishmania* sp. Peptides 1, 2, 3 and a MIX of these macromolecules were subsequently emulsified in complete and incomplete Freund's adjuvant and injected subcutaneously in *golden* hamsters. Anti-peptides antibodies were reactive to the soluble antigen (SA) of *L. braziliensis*, in evaluation in vitro by Western blot. Sera from hamsters that received the peptide 1 presented antibodies that recognized proteins bands between 76 and 150 kDa from *L. braziliensis*. Sera from animals that received the peptides 2 and 3 presented antibodies that recognized bands between 52 and 76 kDa of *L. braziliensis*, as well as the MIX. These results show a new way on the discovery of molecules with therapeutic purposes, immunoprophylactic, for diagnosis and research on Leishmaniasis.

Key words: leishmaniasis. Chemical synthesis. Antigen. Immunodiagnosis. Synthetic peptides.

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um problema de saúde pública, pois representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e epidemiológico (BRASIL, 2010).

A identificação de epítomos proteicos que sejam capazes de induzir resposta imune ou de detectar anticorpos é um objetivo essencial para o controle das leishmanioses. Nas últimas décadas, grande número de moléculas vem sendo descritas como candidatas a antígenos para sorodiagnóstico da leishmaniose. Algumas delas são moléculas purificadas ou frações solúveis do parasito. No entanto, antígenos produzidos por engenharia genética vêm sendo pesquisados e validados para pesquisa de anticorpos contra-*Leishmania* (FARGEAS *et al.*, 1996; FUMAGALI, 2008; VÉLEZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012). Porém, estes antígenos ainda apresentam necessidades de adequações dos valores de sensibilidades e especificidades para uso em diagnóstico e imunoproteção.

A técnica de *Phage display* pode representar uma alternativa para busca de novos alvos antigênicos. O peptídeo ou a proteína expressa na superfície de cada fago possibilita a seleção de sequências com base na afinidade da ligação com anticorpos por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY e SMITH, 1988).

Nosso grupo vem empregando essa técnica com sucesso para identificar peptídeos mimotopos de diferentes patógenos (ALBAN, 2011; PEIXOTO, 2011). A técnica também permite a seleção de antígenos úteis na produção de vacinas, visto que para muitas doenças não existe tratamento eficaz ou quando existem estes medicamentos podem ser tóxicos (AUTTRAN *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar e avaliar peptídeos sintéticos obtidos por *Phage display* que possam ser usados em diagnóstico sorológico específico ou imunoprofilaxia da Leishmaniose tegumentar americana.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 DELINEAMENTO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO ESTUDO

São apresentadas resumidamente as etapas realizadas no presente trabalho na FIGURA 1.

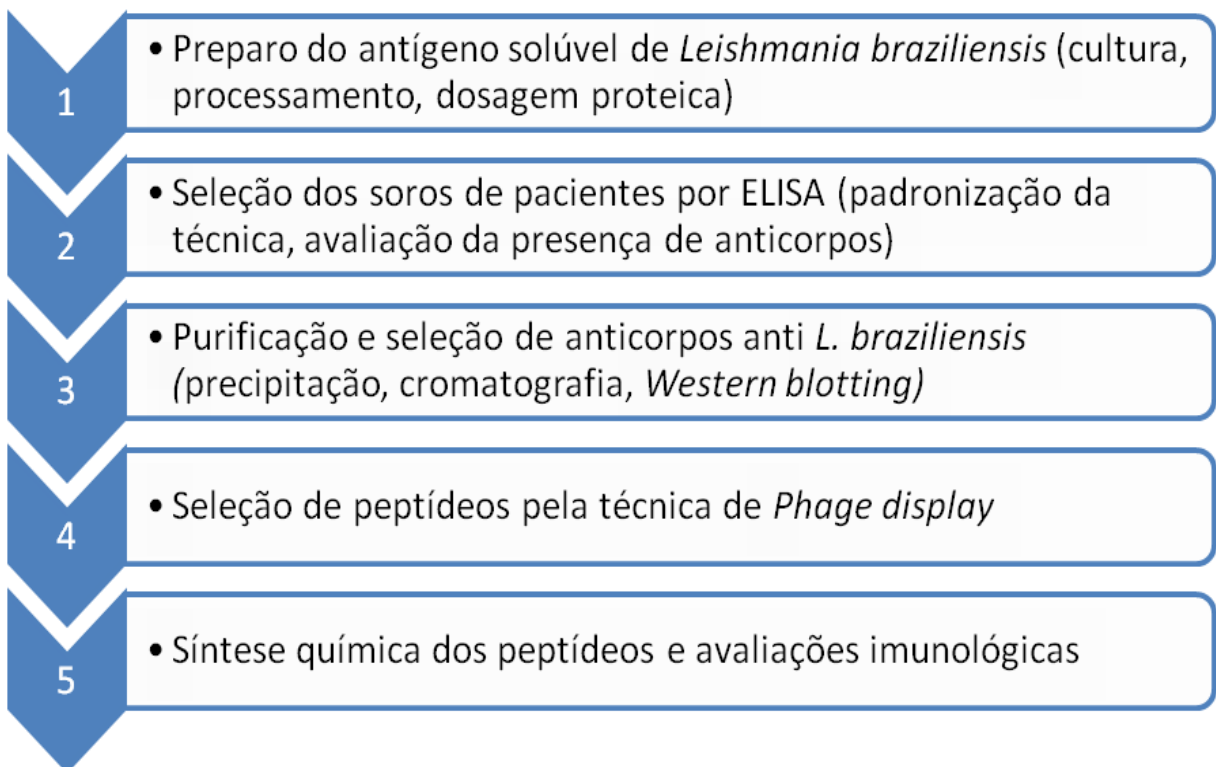


FIGURA 1 - PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS NO PRESENTE ESTUDO

### 2.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (Protocolo 107/11) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais (Protocolo 26/2012).

### 2.3 AMOSTRAS DE SOROS DE INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Foram coletadas amostras de sangue de pacientes portadores de LTA para a obtenção de soros, seleção das imunoglobulinas específicas contra *L. braziliensis* e para avaliação dos antígenos produzidos no presente trabalho. Os voluntários foram provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e de várias Regionais de Saúde do Estado do Paraná. Foram também coletadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis que não apresentaram histórico de leishmaniose ou doença de chagas, moravam em zona indene (livre da doença) e não mantinham contato com pacientes infectados com essas doenças. Os soros foram coletados e armazenados em freezer a -20°C.

### 2.4 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Leishmania braziliensis* E DE *L. amazonensis*

Para realização dos testes ELISA e *Western blotting* foram produzidos antígenos a partir de culturas de promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/Cur22) e de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). As cepas utilizadas foram previamente caracterizadas por isoenzimas e encontram-se armazenadas no criobanco do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR.

Os promastigotas foram cultivados em meio bifásico Novy-McNeal-Nicolle (NNN), com a fase líquida sendo solução salina fisiológica 0,9% esterilizada e apirogênica a 24°C. As cepas foram repicadas entre cinco a sete dias para novos tubos contendo meio de cultura. Após a obtenção de seis tubos, ricos em formas promastigotas, 0,5 mL do sobrenadante de cada tubo foi repassado para garrafas de cultura (100 mL) estéreis contendo o meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Rockville, Maryland, USA) a 10%. Após a multiplicação dos parasitos, as formas promastigotas foram recuperadas por filtração em gaze esterilizada. O conteúdo obtido foi submetido a centrifugação a 3.500 g por 10 minutos a 4°C. Foram realizadas lavagens com solução fisiológica 0,9%, 0,3%, 0,9% e PBS (tampão fosfato-salino) pH 7,2,

respectivamente, para a eliminação do meio de cultura restante, lise das hemácias e remoção da hemoglobina do coelho. A recuperação das células foi feita por centrifugações a 3.500 g por 10 minutos a 4°C.

Após a última centrifugação foi realizado o rompimento dos parasitos ressuspendendo-se o sedimento com água destilada esterilizada num volume igual à metade do volume desse sedimento. Para a lise completa dos protozoários também foram realizados seis ciclos de congelamentos e descongelamentos súbitos imergindo os tubos em nitrogênio líquido até seu congelamento e imediato descongelamento em banho-maria a 37°C. Mantendo os antígenos conservados em banho de gelo foi aplicada a ação do Ultra-Som Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlim, Alemanha) a 150 W por seis séries de 30 segundos com intervalos de um minuto.

O produto resultante foi centrifugado por 30 minutos em ultra-centrífuga a 4°C e 14.000 g. Os sobrenadantes foram recuperados e filtrados em sistema esterilizante (membrana 0,22 µm), o que constituiu o antígeno solúvel (AS) de *L. braziliensis* e de *L. amazonenses*. Em seguida foi realizada dosagem de proteínas dos ASs pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). (SZARGIKI *et al.*, 2009).

Foram feitas aliquotas dos conteúdos antigênicos produzidos que foram armazenadas em tubos criogênicos a -20°C para uso nos experimentos posteriores.

## 2.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *L. braziliensis* E *L. amazonensis*

Para análise do perfil eletroforético do AS de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* produzidos foi realizada a técnica de Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Para isso, 20 µg de cada fração dos antígenos do parasito foram diluídos em tampão de amostra 4X, em presença do agente redutor beta-mercaptoetanol e aquecida a 100 °C por cinco minutos. Essa mistura foi distribuída em canaletas de um gel de poliacrilamida a 15%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V em tampão Tris 0,025M, glicina 0,2M e SDS 0,5%, pH 8,3.

Terminada a corrida foi realizada a coloração do gel por nitrato de prata. Para isso, o gel foi lavado com água destilada por cinco minutos, fixado com metanol 50% por 20 minutos e lavado por mais 10 minutos com água destilada. Posteriormente, o gel foi fixado com glutaraldeído 10% por 30 minutos, e lavado com água por quatro vezes por 10 minutos. Para corar as proteínas, uma solução de nitrato de prata 1% foi preparada, adicionando-se 53% de hidróxido de sódio a 0,36% e 3,5% de hidróxido de amônio. O gel foi corado por 20 minutos ao abrigo de luz e lavado duas vezes com água destilada por cinco minutos. Para revelação, o gel foi incubado com solução contendo 0,25% de ácido acético e 0,1% de formaldeído. Para parar a reação foi adicionada uma solução de parada contendo ácido acético 1% por 20 minutos.

## 2.6 SELEÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*L. braziliensis*

Os soros dos pacientes com LTA e dos indivíduos não portadores de LTA foram testados pelo método ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra *Leishmania*. Para a padronização deste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA), anti-imunoglobulina G humana Fc específica conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e o cromógeno OPD (Ortofenilenodiamina - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

Foram analisadas quatro concentrações dos antígenos de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* (125, 250, 500 e 1.000 ng/poço), frente a três diluições (1:25, 1:50 e 1:100) dos soros (controles positivos e negativos e amostras teste) e três diluições do conjugado (1:5000, 1:7500 e 1:10.000). Em todos os testes ELISA, realizados durante este trabalho, os soros foram avaliados em duplicatas e os resultados apresentados representam a média de cada amostra. As diluições do conjugado, do soro e dos antígenos capazes de melhor discriminar entre controles positivos e negativos foram selecionadas. Os testes passaram a ter a seguinte padronização: antígenos 500 ng por poço, soro diluído 1:100 e conjugado diluído 1:10.000.

Para a avaliação de todos os soros dos pacientes e seleção das imunoglobulinas o teste foi realizado fazendo-se a sensibilização das placas com 100 µL do antígeno produzido (500 ng) em *coating buffer* (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,16%, NaHCO<sub>3</sub>



0,29%, pH 9,6) por poço e incubação *overnight* a 4°C. Após esta etapa, a solução de antígeno foi descartada e as placas lavadas, duas vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. O bloqueio dos espaços dos poços não ocupados pelo antígeno foi realizado, por uma hora a 37°C, adicionando-se 120 µL de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS pH 7,4) por poço. Após incubação, nova lavagem da placa foi realizada. Os soros diluídos (1:100) em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05%) foram adicionados à placa e incubados em estufa a 37°C por uma hora. As placas foram novamente lavadas, por quatro vezes, foram adicionados 100 µL por poço do conjugado anti-humano diluído 1:10.000 em tampão de incubação e as placas incubadas por uma hora a 37°C. Foram realizadas quatro lavagens das placas e o substrato, composto por uma pastilha de OPD (2 mg) diluída em 10 mL de tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% foram aplicados. Após 15 minutos, ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL da solução de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (leitor de microplaca) no comprimento de onda de 492 nm.

Para determinação do nível de corte (*Cut-off*) do teste, as 37 amostras de soro humano provenientes de zona indene para leishmaniose no Estado do Paraná foram analisadas contra o AS. A média obtida das absorbâncias dessas 37 amostras foi somada a duas vezes o desvio padrão obtido para cálculo do *Cut-off*.

## 2.7 PRECIPITAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS ANTI-*Leishmania* COM SULFATO DE AMÔNIO

Foi realizada a seleção de imunoglobulinas totais para posterior purificação de IgGs contra - *L. braziliensis*. Para isso, foram utilizados os soros de pacientes (positivos no teste ELISA indireto descrito no item 2.6) que compuseram um *pool* de soros humanos. Esse conteúdo foi centrifugado por 30 minutos a 3.000 g a 4°C. Em banho de gelo e sob agitação, o sobrenadante obtido teve suas imunoglobulinas precipitadas por adição lenta de igual volume de solução de sulfato de amônio saturada, conforme descrito por Harlow e Lane (1988). A mistura foi deixada em repouso a 4°C *overnight* e posteriormente foi transferida para tubos de 50 mL e

centrifugada por 30 minutos a 3.000 g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as imunoglobulinas presentes no precipitado foram reconstituídas em PBS pH 7,4. O conteúdo foi adicionado a membranas de dializadoras e dialisado contra PBS, pH 7,4, para remoção do sulfato de amônio.

#### 2.7.1 SDS-PAGE para avaliação da purificação das imunoglobulinas por precipitação com sulfato de amônio

A pureza e a massa molecular das imunoglobulinas, obtidas pela precipitação dos soros em sulfato de amônio, foram avaliadas por SDS-PAGE. Para esta etapa realizou-se a eletroforese, com gel na concentração de 10% e amostras preparadas sob condições redutoras e não redutoras. Essa metodologia permite a visualização da retirada da albumina presente no soro.

A técnica de SDS-PAGE foi realizada conforme item 2.5 com a diferença de que terminada a corrida eletroforética, os géis foram lavados em água destilada e corados em solução de *Comassie Blue*, por uma hora, com agitação e descorado em solução de descoloração também sob agitação e a temperatura ambiente.

### 2.8 OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DA SUB- CLASSE G (IgGs)

Para posterior realização dos ciclos de seleção (*pannings*) da técnica de *Phage display*, a purificação de IgGs anti - *L. braziliensis* dos pacientes com LTA ocorreu em duas etapas. Inicialmente, as IgGs foram purificadas por cromatografia de afinidade em proteína G-agarose, seguida da purificação das imunoglobulinas a partir de antígenos transferidos para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF - Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA).

As imunoglobulinas da classe G foram obtidas por cromatografia de afinidade em proteína G - agarose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) com o objetivo de que a porção Fc das IgGs reconhecesse a molécula da proteína G fixada na resina e assim fosse possível recuperar este tipo específico de anticorpo.

A ligação entre o antígeno (Proteína G - agarose) e os anticorpos (imunoglobulinas G) foi realizada aplicando-se uma fração das imunoglobulinas totais à coluna de proteína G - agarose, que permaneceu sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. A coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 até não se detectar mais proteínas pelo teste de Bradford (1976). As IgGs foram eluídas por mudança de pH com tampão glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,7, recolhidas e neutralizadas com tampão Tris-HCl, 1 M, pH 9,0. Em seguida, a coluna foi reequilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. As frações contendo as imunoglobulinas G obtidas foram reunidas numa só amostra, dialisadas contra PBS 7,4 (para remoção o excesso de sais que poderiam atrapalhar as etapas posteriores de caracterização de proteínas) e concentradas usando o dispositivo Amicon Ultra-15 10 kDa (Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA). A pureza e a massa molecular da solução de imunoglobulinas foram avaliadas por SDS-PAGE conforme descrito no item 2.7.1.

## 2.9 OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICA PARA *L. braziliensis*

Para obtenção de imunoglobulinas G anti-*L. braziliensis*, dois miligramas de antígenos de *L. braziliensis* foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (conforme descrito no item 2.5) e transferidas para membrana de PVDF em tampão composto de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol *overnight* a 24 V, seguidos de uma hora a 48 V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween 20 em PBS pH 7,4 por uma hora, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS Tween 20 0,05% (PBST-0,05%) por três vezes de cinco minutos e incubada com 3 mg de IgGs diluídas em PBST-0,05%. Após a incubação de duas horas a membrana foi lavada com PBST-0,05%, por cinco vezes de cinco minutos e os anticorpos foram eluídos por adição de tampão glicina 0,1 M, NaCl 0,15M, pH 2,7 sob agitação por 30 minutos. A solução de anticorpos eluídos foi recuperada e imediatamente neutralizada com Tris-HCl, 1 M, pH 9,0. Os anticorpos obtidos foram concentrados usando o dispositivo Amicon Ultra 15 10kDa (Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA) e a dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

### 2.9.1 Avaliação da purificação e reatividade das imunoglobulinas específicas anti- *L. braziliensis* obtidas por *Western blotting*

Para avaliar a purificação e a reatividade das imunoglobulinas anti-*L. braziliensis* foram realizadas as técnicas ELISA e *Western blotting*. O teste ELISA foi realizado conforme descrito no item 2.6. Para o *Western blotting*, foi realizada primeiramente a técnica SDS-PAGE (conforme descrito no item 2.7.1) com antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (40 µg de antígenos por canaleta) e posteriormente foi realizada a eletrotransferência do gel contendo os antígenos para membrana de PVDF (Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA). A transferência se deu sob a uma corrente de 24 V *overnight* e 48 V por uma hora em tampão de transferência com pH 8,3 composto por de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol.

Terminada estas etapas a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween 20% em PBS pH 7,4 por uma hora sob agitação, a fim de se evitar interações inespecíficas. A membrana foi então lavada, por quatro vezes, de cinco minutos cada com 0,05% de Tween 20 em PBS pH 7,4 e a seguir foi incubada por duas horas, sob agitação com as imunoglobulinas específicas anti-*L. braziliensis* (40 µg/mL em PBS pH 7,4). Após a incubação, a membrana foi lavada quatro vezes de cinco minutos cada. Posteriormente foi incubada por uma hora, a temperatura ambiente, sob agitação com o anticorpo anti IgG humano Fc específico conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) na diluição 1:5.000 por uma hora. Finalmente, após nova lavagem, foi realizada a revelação com uma solução de 1 mg DAB (Tetrahidrocloro 3,3'-Diaminobenzidina) em 1,5 mL de 50 mM Tris, 0,15 M, NaCl pH 7,6 e 1,2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% por tira (cada tira foi incubada com 1,5 mL). A solução de revelação foi mantida até o aparecimento das bandas e a reação foi parada por lavagem das tiras com PBS pH 7,4.

## 2.10 TÉCNICA *PHAGE DISPLAY*: EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS NA SUPERFÍCIE DE FAGOS

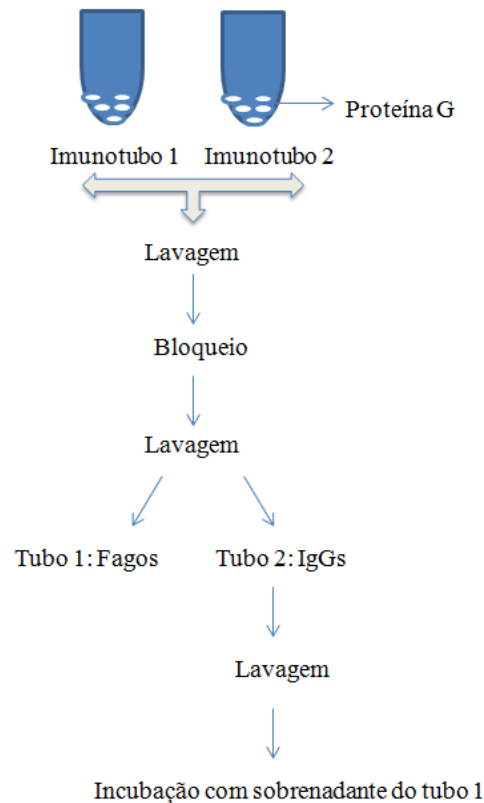
Após a obtenção dos anticorpos IgG anti-*L. braziliensis* a partir do soro de pacientes, foi realizada a técnica de *Phage display* como descrito por Villard *et al.* (2003), com modificações descritas abaixo.

Inicialmente, dois imuntubos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidos com 10 µg de proteína G (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluída em TBS (solução salina tamponada com Tris - 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7,5) e foram incubados, sob agitação, a 4°C, *overnight*. Posteriormente, os imuntubos foram lavados duas vezes com tampão de lavagem (TBS-T 0,05%), bloqueados com 3% BSA em TBS-T 0,05% por duas horas a 37 °C e lavados novamente.

Conforme apresentado na FIGURA 2, os dois imuntubos tiveram etapas distintas na técnica de *Phage display*. No tubo um, foram adicionados  $5 \times 10^{12}$  fagos de quatro diferentes bibliotecas de peptídeos (LX4, LX8, X8CX8, X15) obtidas de J. Scott (Simon Fraser University, Canadá), que permaneceram incubadas *overnight* a 4°C. Já no imuntubo dois, 5 µg de IgGs específicas diluídas em 1,5 mL de TBS foram adicionadas onde permaneceram *overnight* a 4°C.

Após o período de incubação, o sobrenadante do imuntubo dois foi desprezado e o sobrenadante do imuntubo um (contendo fagos que não se ligam a proteína G) foi adicionado ao imuntubo dois onde permaneceu, sob incubação, *overnight* a 4°C.

Foram realizados quatro *pannings* sendo que, no primeiro, utilizou-se 5 µg/mL do anticorpo específico anti-*L. braziliensis*, e para o segundo, terceiro e quarto *pannings*, 2,5 µg/mL, 1 µg/mL e 1 µg/mL respectivamente.



**FIGURA 2 - ETAPA INICIAL DA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY*.** Dois imunotubos foram revestidos com proteína G. Posteriormente, os imunotubos foram lavados e bloqueados com BSA. Após a etapa de lavagem, no tubo um, foram adicionados fagos bibliotecas de peptídeos. Já no imunotubo dois, foram adicionados IgGs específicas. Após o período de incubação, o sobrenadante do imunotubo dois foi desprezado e o sobrenadante do imunotubo um foi adicionado ao imunotubo dois onde permaneceu, sob incubação, *overnight* a 4°C.

O imunotubo que permaneceu no desenvolvimento desta metodologia (tubo dois) teve seu sobrenadante descartado e então foi lavado 10 vezes com TBST-0,5% e cinco vezes com TBS-T 0,05% para a retirada dos fagos não ligados. Posteriormente, os fagos cujos peptídeos foram reconhecidos pelos anticorpos de pacientes, foram eluídos durante 30 minutos por modificação de pH da solução com auxílio do tampão glicina, 0,1 mol/L, pH 2,2, BSA 1 mg/mL. O eluato foi transferido para um microtubo e neutralizado imediatamente com tampão Tris-HCl, 2 mol/L, pH 9,0.

Para amplificação dos fagos, à 10 mL da solução de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*), cepa K91 (densidade ótica a 550 nm = 1,9) preparadas previamente em meio Luria Bertani (LB), adicionaram-se 1,5 mL do eluato contendo os fagos. O conteúdo foi incubado por 10 minutos a 37°C sem agitação e posteriormente, adicionadas a 100 mL de meio LB pré-aquecido a 37°C contendo 0,2 µg/mL de tetraciclina (o gene de resistência a tetraciclina presente no genoma do fago é o que possibilita o crescimento e seleção de bactérias infectadas com fagos). Após 30 minutos de indução em agitação a 225 rpm, ajustou-se a concentração de

tetraciclina para 20 µg/mL. O crescimento bacteriano ocorreu *overnight* a 37°C e sob agitação de 225 rpm.

Os fagos amplificados foram purificados com precipitação em polietilenoglicol 8000 (PEG 8.000) 20%, NaCl 2,5 M. Para isso, a cultura de bactérias foi primeiramente colocada em tubos de 250 mL e centrifugada a 4°C, a 5.000 g durante 20 minutos. O pélete formado (composto principalmente por bactérias), foi ressuspendido em meio LB e estocado em freezer -80°C com de 15% de glicerol. O sobrenadante contendo os fagos foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 15% de PEG 8.000 20%, NaCl 2,5 M. O conteúdo foi misturado por inversão e precipitado *overnight* em gelo a 4°C. A solução foi centrifugada a 4°C, a 12.000 g por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em tampão TBS. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 14.500 g por 15 minutos a 4°C para remoção de possíveis restos celulares. Os fagos obtidos foram empregados em um próximo ciclo de seleção ou armazenados a -20°C.

Titulou-se o *pool* de fagos adicionando-se 10 µL de cada uma das diluições dos fagos  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  para a titulação parcial e  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$  para a titulação final), em 200 µL de bactérias *E. coli* K91 previamente cultivadas. Entende-se para titulação parcial, o título dos fagos eluídos e não amplificados e titulação total, o título dos fagos após amplificação. Os microtubos foram incubados por 15 minutos a 37°C sem agitação e por mais 15 minutos a 37°C sob agitação de 225 rpm.

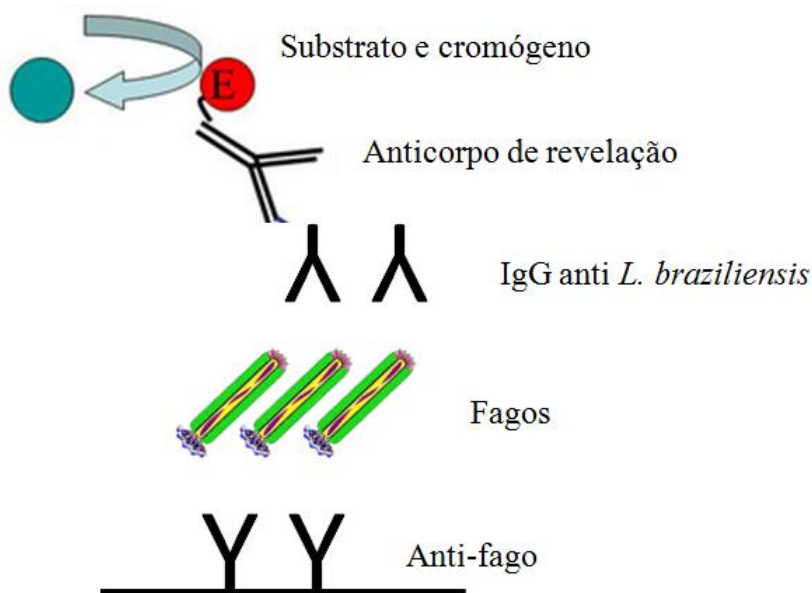
As células foram plaqueadas em ágar LB contendo 20 µg/mL de tetraciclina, para posterior contagem das colônias. As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C. O título foi determinado multiplicando o número de colônias pelo fator de diluição da placa e por 100 para obter-se o número de fagos por mL.

## 2.11 ELISA INDIRETO PARA AVALIAR A REATIVIDADE DOS FAGOS DOS PANNINGS

Após o quarto ciclo de seleção, a reatividade dos fagos dos *pannings* reconhecidos pelos anticorpos de pacientes foi avaliada por ELISA conforme apresentado na FIGURA 3.

Uma placa de 96 poços (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA) foi sensibilizada com 0,5 µg/mL de anticorpos comerciais anti-fago (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) em *coating buffer* (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6), *overnight* a 4°C. As cavidades foram lavadas por duas vezes com NaCl 0,9% Tween 20 - 0,05%. O bloqueio dos sítios livres foi feito utilizando-se uma solução de caseína 2% em PBS pH 7,4 durante 1 hora a 37°C. A cada poço, foram adicionados 10<sup>9</sup> fagos eluídos de cada ciclo de seleção juntamente com tampão de incubação. A placa foi incubada por uma hora a 37°C. Após, as cavidades foram lavadas quatro vezes e incubadas a 37°C durante uma hora com o IgGs anti-*L. braziliensis* (10 µg/poço), e posteriormente, com o anticorpo anti IgG humana porção Fc específica conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluído 1:10.000. As cavidades foram lavadas novamente por quatro vezes.

Para revelação da reação foi adicionado o substrato, composto por uma pastilha de 2 mg de OPD diluídas em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 15 minutos, ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL da solução de ácido sulfúrico 1:20 em toda a placa. A leitura foi realizada levando-se placa imediatamente ao leitor de microplaca em comprimento de onda de 492 nm.



**FIGURA 3 - ETAPAS DO TESTE ELISA ELISA INDIRETO PARA AVALIAR A REATIVIDADE DOS FAGOS DOS PANNINGS.** Uma placa de ELISA foi sensibilizada com 0,5 µg/mL de anticorpos comerciais anti-fago. Fagos (10<sup>9</sup>) eluídos de cada *panning* foram adicionados. Anticorpos contra *L. braziliensis* (10 µg/poço) reconheceram os fagos presentes. A detecção da reação foi realizada utilizando-se anticorpos anti-IgG humano conjugado a peroxidase e OPD como cromógeno.



## 2.12 AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS

Para a identificação de clones de fagos com capacidade de ligação a anticorpos de pacientes com leishmaniose o *panning* mais imunorreativo foi escolhido. Colônias isoladas foram obtidas após o cultivo em ágar LB em placas de Petri 140 x 15mm. Depois do crescimento, cada colônia bacteriana isolada foi pinçada com palitos esterilizados e transferida para uma cavidade de placa de cultura de 96 poços fundo em U contendo 200  $\mu$ L de meio LB e 20  $\mu$ g/mL de tetraciclina. Após cultivo *overnight* em *shaker* com rotação de 225 rpm a 37°C, a placa foi centrifugada a 1.600 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante da placa de cultura contendo os fagos foi usado diretamente para realização do teste ELISA.

Cada fago foi testado por teste ELISA com soro de pacientes, conforme apresentado na FIGURA 4 e seguindo os procedimentos adotados no item 2.11 com as seguintes modificações: a cada poço foram adicionados 50  $\mu$ L do sobrenadante da cultura de cada clone de fago em 50  $\mu$ L de tampão de bloqueio. Foi usado soro de pacientes diluído 1:100. Os clones foram selecionados com *pool* de soros de alta absorvância (acima de 0,5) em teste ELISA com AS de *L. braziliensis*. Os fagos foram testados também com *pool* de soros com absorvâncias de 0,2 e 0,3.

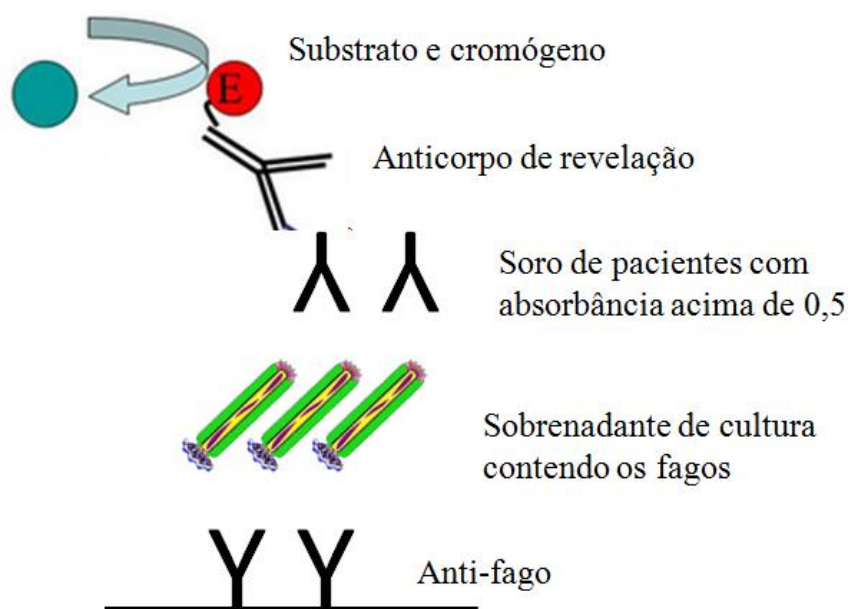


FIGURA 4 – ETAPAS DA REALIZAÇÃO DO TESTE ELISA PARA AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DOS CLONES DE FAGOS. Uma placa de ELISA foi sensibilizada com 0,5  $\mu$ g/mL de anticorpos comerciais anti-fago. Fagos ( $10^9$ ) eluídos de cada *pannings* foram adicionados. Anticorpos contra *L. braziliensis* (10  $\mu$ g/poço) reconheceram os fagos presentes. A detecção da reação foi realizada utilizando-se anticorpos anti-IgG humano conjugado a peroxidase e OPD como cromógeno.

## 2.13 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS

Os clones de fagos mais reativos (absorbância acima de 0,3) foram selecionados para sequenciamento do DNA e posterior identificação da sequência de aminoácidos inserida nos fagos. Para isso, os clones de fagos positivos amplificados em *E. coli*, foram submetidos à extração do DNA usando o kit QIAprep spin M13 (Qiagen, Hilden, Alemanha), realizada conforme instruções do fabricante. A concentração dos ácidos nucleicos foi dosada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific - Wilmington, Delaware, USA), os DNAs foram aliquotados e armazenados a -20° até seu uso. As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, USA). Para cada reação foi usado 50 ng de DNA em volume final de 10 µL, contendo 1 µL de Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction MIX, 1 µL de tampão de sequenciamento 5X e 1,6 pmol do *primer reverse* (5'- TCG GCA AGC TCT TTT AGC – 3'). As condições do sequenciamento foram: um minuto à 96°C para desnaturação inicial do DNA seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por cinco segundos e extensão a 60°C por quatro minutos. Para purificação do DNA foi adicionado isopropanol aos microtubos para uma concentração final de 60%. Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 25 minutos. O isopropanol foi removido por inversão em papel absorvente e aos tubos foi adicionado etanol 70%. Após centrifugação a 15.000 g por 10 minutos, o etanol foi removido, os tubos foram colocados em estufa a 37°C para secagem do pélete de DNA e armazenados a -20°C.

A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied biosystems, Foster City, California, USA) foi realizada em software do próprio equipamento.

Após a identificação do DNA viral, foi usado o programa *Proteomics Tools* disponível em <http://www.expasy.ch> (opção *Tools – DNA-Proteins – Translate*, leitura de tradução de proteína 3'→5', utilizando-se a primeira janela de leitura - *frame 1*) para obtenção de sequência de aminoácidos codificada pelo segmento de DNA inserido no fago, bem como para obter o peso estimado de cada peptídeo.

As sequências dos peptídeos obtidas foram analisadas quanto à sua similaridade com outras sequências já registradas no GenBank.

## 2.14 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Uma vez selecionados, os peptídeos foram sintetizados quimicamente pela estratégia Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonila), utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que usa aminoácidos especiais para a síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à resina. O protocolo foi realizado conforme Merryfiel (1965) e usando o sintetizador de peptídeos automático MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Alemanha).

Esta técnica consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc, sua cadeia lateral também está protegida por um grupo protetor para evitar reações indesejadas.

Ciclos de acoplagem (de aminoácidos com seus ativadores) e desproteção (remoção do grupamento Fmoc pela presença de piperidina 20%) são realizados até que todos os aminoácidos do peptídeo a ser sintetizado estejam acoplados. Após o término do último ciclo, o peptídeo já sem o grupamento Fmoc do último aminoácido é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem. Nesta etapa também se elimina os grupamentos protetores da cadeia lateral. Em seguida esta solução é filtrada e precipitada com éter etílico gelado obtendo-se assim o peptídeo. Após centrifugação o éter é eliminado por evaporação. Os peptídeos foram liofilizados, pesados, dissolvidos em água mili-Q e armazenados a -20°C na concentração de 1 mg/mL.

A identidade dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massa em espectrômetro Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e software FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A técnica foi realizada no

Centro de Biologia Molecular e Estrutural – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

## 2.15 CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS À PROTEÍNA CARREADORA KLH

Na etapa de imunização de animais, para que os peptídeos deixassem de ser haptenos foi necessário o acoplamento destas moléculas com a proteína KLH (hemocianina do molusco *Keyhole limpet*) com kit específico (Pierce, Rockford, Illinois, USA) para esta finalidade.

A proteína KLH é isolada da hemolinfa de um molusco e devido ao seu alto peso molecular trata-se de um importante imunógeno. Também por tratar-se de uma proteína de molusco apresenta uma distância filogenética grande dos mamíferos, fato este que favorece a imunogenicidade desta molécula. O grande número de resíduos de lisina disponíveis faz do KLH uma das principais moléculas de acoplamento a peptídeos (HERMANSON, 1996).

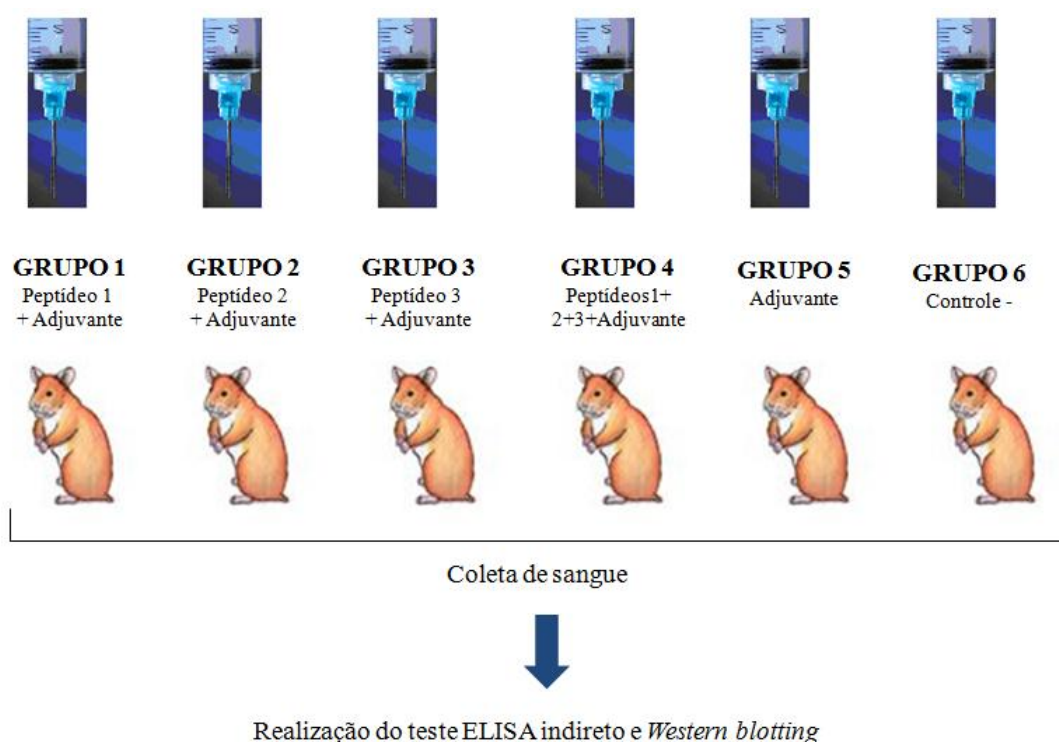
A proteína carreadora ativada foi reconstituída em água ultrapura e dois miligramas dos peptídeos foram pesados e dissolvidos em tampão de conjugação contendo DMF (N,N-Dimethylmethanamide). Uma alíquota do peptídeo foi separada para cálculo dos grupos sulfidril livres com reagente de Ellmann. O peptídeo e a proteína ativada foram misturados e incubados sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente o conteúdo foi centrifugado a 2000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado e submetido a coluna de filtração para remoção de EDTA e azida sódica. A dosagem de proteína foi realizada usando o kit Micro BCA™ Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

## 2.16 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS

Os peptídeos-KLH (1, 2, 3 isoladamente e o MIX dos três peptídeos) diluídos em NaCl 0,9% estéril foram utilizados para imunizar hamsters *golden* (*Mesocricetus auratus*), conforme descrito por GAMBOA (2008). hamsters fêmeas de quatro

semanas de idade foram adquiridos do fornecedor Anilab de Paulínea – SP. Após a chegada ao biotério, os animais tiveram um período de adaptação de uma semana. Durante todo o experimento os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*.

Para realização deste experimento foram constituídos seis grupos experimentais (FIGURA 5) compostos por dez animais por grupo. Os animais foram imunizados com peptídeos individuais ou combinados (MIX). Um grupo controle negativo não recebeu nenhum tipo de imunização. Outro grupo recebeu somente o adjuvante em veículo de imunização.



**FIGURA 5 - GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS.** Seis grupos experimentais de dez animais cada foram formados. Os animais foram imunizados com peptídeos individuais ou combinados (MIX). O grupo 5 recebeu somente o adjuvante em veículo de imunização. O grupo 6 corresponde ao controle negativo e não recebeu nenhum tipo de imunização.

Os peptídeos sintéticos foram emulsionados na primeira imunização, em adjuvante completo de *Freund* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e, nas demais imunizações, em adjuvante incompleto de *Freund* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Foi inoculado 20 µg de peptídeo-KLH por animal, no dorso e pela via subcutânea, num volume total de 100 µL. Foram aplicadas quatro doses

deste inóculo com intervalos de 30 dias (TABELA 1). Soro não imune foi usado como controle negativo e soro imune foi obtido sete dias após a última imunização. As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia safena dos animais previamente anestesiados.

TABELA 1 - PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS HAMSTERS COM OS PEPTÍDEOS-KLH

<b>Dia</b>	<b>Dose de peptídeo (µg em 100 µL)</b>	<b>Imunização</b>
0	20	1 <sup>a</sup>
30	20	2 <sup>a</sup>
60	20	3 <sup>a</sup>
90	20	4 <sup>a</sup>

Nota: O Grupo 4 recebeu 20 µg de cada peptídeo, resultando em 4 imunizações de 60 µg cada.

## 2.17 ELISA PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-PEPTÍDEOS

Após a coleta de sangue dos hamsters imunizados com os peptídeos (FIGURA 5) um teste ELISA foi realizado para avaliar a presença de anticorpos específicos anti-peptídeos.

A sensibilização da placa com antígeno foi realizada aplicando-se 0,2 µg/poço de cada peptídeo, diluído em solução de tampão carbonato 0,05 M pH 9,6, e incubada *overnight* a 4°C. Após esta etapa as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 - 0,05%) e bloqueadas adicionando-se 120 µL de tampão de bloqueio (caseína 2% em PBS pH 7,4) por poço. Após incubação por uma hora em estufa a 37°C a placa foi lavada duas vezes. Os soros, diluídos 1:50 em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05% - *pool* dos dez animais de cada grupo), foram aplicados nos poços e a placa foi incubada por uma hora em estufa a 37°C. Posteriormente a placa foi submetida a quatro lavagens para retirada das imunoglobulinas não ligadas ao

antígeno. O conjugado anti-IgG total de hamster ligado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) foi adicionado na concentração de 200 ng/mL. A placa foi incubada por mais uma hora em estufa a 37°C.

Após incubação foram realizadas quatro lavagens da placa e o substrato, composto por uma pastilha de OPD (2 mg) diluída em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% foi aplicado. Após incubação por 15 minutos, ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL da solução de ácido sulfúrico 1:20 em toda a placa. A leitura foi realizada levando-se a placa imediatamente para o leitor de microplaca e a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 492 nm.

## 2.18 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE IgGS DE HAMSTERS INOCULADOS COM PEPTÍDEOS FRENTE A ANTÍGENOS DE *L. braziliensis*

Para avaliar se os anticorpos anti-peptídeos produzidos em hamsters reconheceriam antígenos de *L. braziliensis* foi usada a técnica *Western blotting* (de acordo com o item 2.9.1).

Primeiramente, os antígenos de *L. braziliensis* foram submetidos à técnica de eletroforese em SDS-PAGE conforme item 2.5. Após a eletrotransferência, a membrana foi bloqueada com BSA 3%, Tween 20-0,05% em PBS pH 7,4 por uma hora sob agitação. A membrana foi então lavada, por quatro vezes, de cinco minutos e foi incubada com o *pool* do soro dos animais imunizados (diluídos 1:100 em tampão de incubação - BSA 3%, Tween 20-0,05% em PBS pH 7,4). Após a lavagem foi efetuada a adição do conjugado anti-IgG total de hamster ligado peroxidase em 100 ng/mL. Após incubação foram realizadas quatro lavagens e a revelação foi realizada com solução contendo 1 mg de DAB em 1,5 mL de Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,6 e 1,2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% por tira (cada tira foi incubada com 1,5 mL). A solução de revelação foi incubada até aparecimento das bandas e a reação foi parada por lavagem das tiras com PBS pH 7,4.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS

Após a realização da dosagem de proteínas obteve-se 5,19 mg/mL para *L. braziliensis* e 1,58 mg/mL para *L. amazonensis*. As proteínas foram aliquotadas e armazenadas para todos os experimentos subsequentes.

#### 3.2 SDS-PAGE DE ANTÍGENOS DE *L. braziliensis* E *L. amazonensis*

O perfil eletroforético dos antígenos solúveis de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* foi obtido em gel de poliacrilamida 15% em condições redutoras (FIGURA 6). Ambos os extratos antigênicos apresentaram massas proteicas entre 15 e 100 KDa. Na coluna 2 pode-se observar aproximadamente 12 bandas presentes nos antígenos de *L. braziliensis* enquanto que na coluna 3 observa-se um total aproximado de 11 proteínas para o antígeno de *L. amazonensis*. Este resultado demonstra o compartilhamento de proteínas entre as duas espécies estudadas.

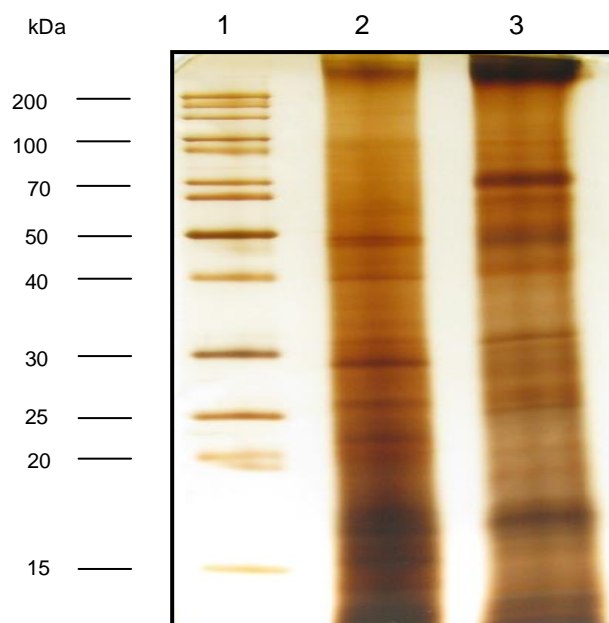


FIGURA 6 – SDS-PAGE DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *L. braziliensis* E *L. amazonensis*. Colunas: 1- Padrão de massa molecular; 2- *L. braziliensis*; 3- *L. amazonensis*. Vinte microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta de um gel de poliacrilamida a 15%, posteriormente foi adicionado o soro de pacientes com LTA e finalmente o gel foi corado por nitrato de prata.



Esta etapa foi importante para confirmação da extração das proteínas a serem utilizadas no presente estudo, bem como para a avaliação da similaridade de proteínas totais das duas espécies de *Leishmania* disponíveis.

### 3.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Dos 198 soros de pacientes analisados pelo teste ELISA, 57 soros foram considerados positivos para LTA, pois apresentaram absorbância superior a 0,139 (valor do *Cut-off* estabelecido). Das amostras de soro destes pacientes foi formado um *pool* de  $\pm 50$  mL para precipitação das imunoglobulinas. A eletroforese em SDS-PAGE, sob condições redutoras e não redutoras, demonstra a presença da banda referente à albumina presente nas IgGs totais do soro humano precipitadas por sulfato de amônio (coluna dois). A albumina possui peso molecular de aproximadamente 60 kDa e na coluna três observa-se a retirada dessa molécula representando o êxito da etapa de cromatografia de afinidade para obtenção de imunoglobulinas da subclasse G (FIGURA 7).

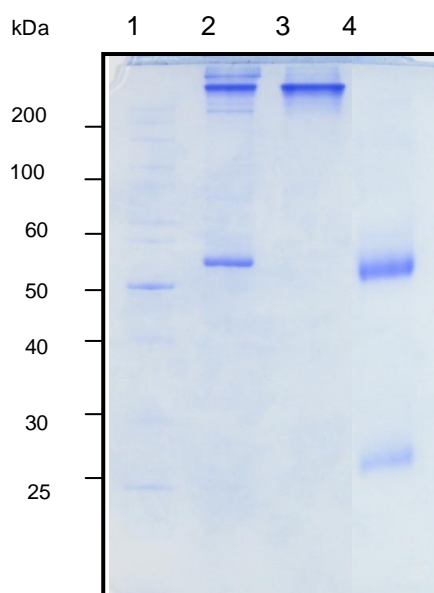


FIGURA 7 – SDS-PAGE DE IgGs TOTAIS DE PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR PURIFICADAS POR PRECIPITAÇÃO POR SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE. Colunas: 1- Padrão de massa molecular; 2- IgGs totais precipitadas por sulfato de amônio em condições não redutoras; 3- IgGs totais purificadas por cromatografia de afinidade sob condições não redutoras; 4- IgGs totais purificadas por cromatografia de afinidade sob condições redutoras. Três microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta de um gel de poliacrilamida a 10% corado por azul de Coomassie.

As imunoglobulinas G, obtidas após cromatografia de afinidade, foram avaliadas quanto sua reatividade frente a antígenos de *Leishmania* sp. por *Western Blotting* (FIGURA 8). Observou-se a reatividade frente a soro de paciente sabidamente positivo (colunas dois e quatro) e contra IgGs purificadas por cromatografia de afinidade (colunas três e cinco).

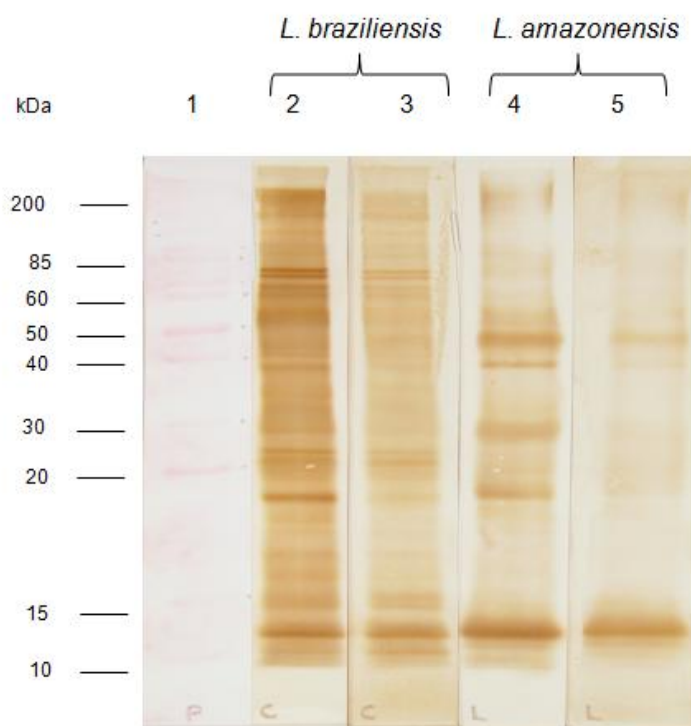
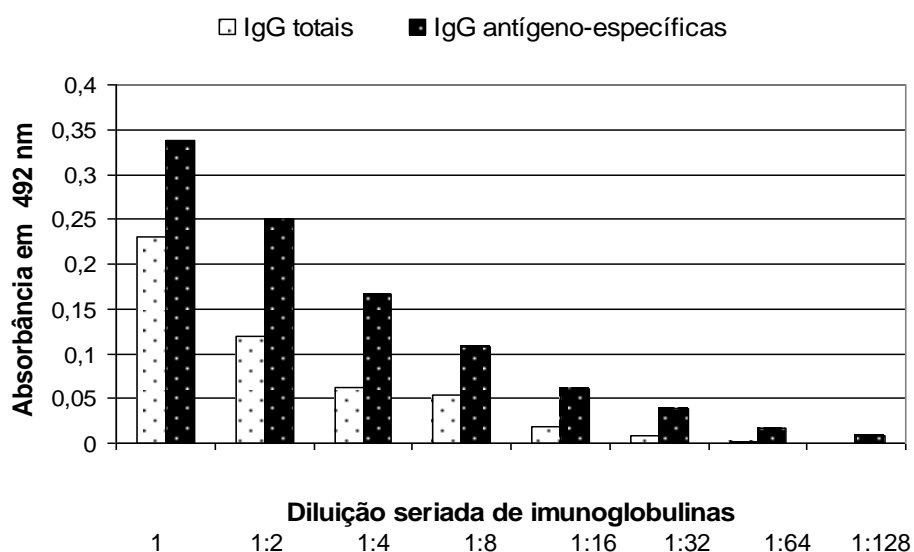


FIGURA 8 – REATIVIDADE DE IgGs TOTAIS DE PACIENTES COM LTA FRENTE A ANTÍGENOS DE *L. braziliensis* e *L. amazonensis* - REAÇÃO OBSERVADA EM *WESTERN BLOTTING*. Padrão de massa molecular (coluna 1). Quarenta microgramas de antígeno de *L. braziliensis* (colunas 2 e 3) e *L. amazonensis* (colunas 4 e 5) foram separados por SDS-PAGE a 15%. Foi realizado *Western Blotting* com soro humano positivo para leishmaniose tegumentar diluído 1:50 (colunas 2 e 4) e 40 µg/mL de IgGs totais (colunas 3 e 5). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana conjugado à peroxidase e usando DAB como cromógeno.

Bandas reativas foram visualizadas tanto com IgG total como na presença das IgGs purificadas. Nota-se que existe reação cruzada entre as diferentes espécies de *Leishmania* analisadas. Um exemplo pode ser constatado na reatividade entre as bandas de 10 e 15 kDa e de 20 kDa e 50 kDa.

A reatividade das IgGs específicas obtidas anti-*L. braziliensis* foi avaliada por ELISA (FIGURA 9). O ensaio demonstra que as imunoglobulinas específicas mesmo em menores concentrações apresentam testes com absorbâncias maiores daquelas

encontradas no teste com imunoglobulinas totais. Assim, conclui-se que o método de purificação permitiu a concentração de anticorpos antígeno-específicos a serem empregados na técnica de *Phage display*. A purificação das imunoglobulinas específicas de *L. braziliensis*, ocorreu com sucesso, pois, tomando-se como exemplo o primeiro par de barras do gráfico, observa-se que as IgGs específicas para *L. braziliensis*, em uma concentração 10 vezes menor que a da IgG total, apresentaram maior absorvância (FIGURA 9).



**FIGURA 9 - REATIVIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS ANTÍGENO-ESPECÍFICAS POR ELISA.** Uma placa foi sensibilizada com 5 µg/mL de antígeno de *L. braziliensis* e incubada com imunoglobulinas partindo-se de 100 µg/mL para a total (barras claras) e 10 µg/mL para imunoglobulinas antígeno-específicas (barras escuras). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugada à peroxidase e OPD como cromógeno.

### 3.4 PHAGE DISPLAY

Na avaliação da reatividade de cada um dos quatro *pannings* por ELISA foi possível observar aumento progressivo da intensidade de reação indo do primeiro para o quarto ciclo de seleção (FIGURA 10). O número de fagos eluídos foi sempre menor que a quantidade incubada, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados no tubo ficaram ligados a estes pela interação específica destas moléculas (TABELA 2). Pode-se observar aumento de fagos de saída a cada ciclo de seleção demonstrando o enriquecimento de fagos específicos. Esses resultados indicam que ocorreu a seleção de fagos reativos com anticorpos anti-*Leishmania*.

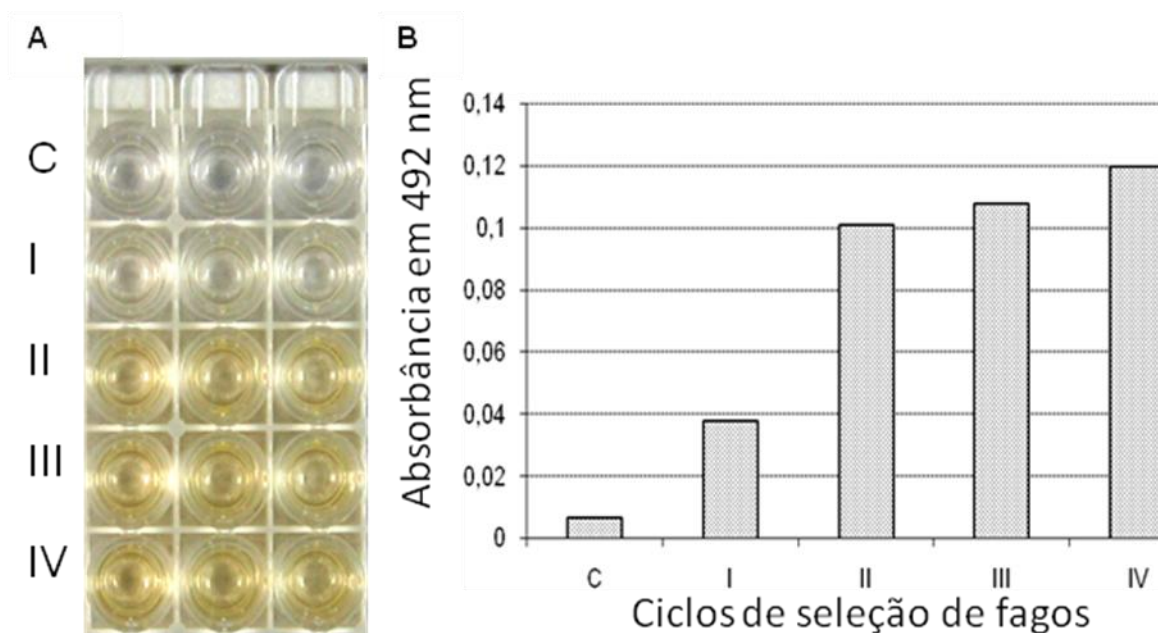


FIGURA 10 - (A) PLACA APRESENTANDO A REAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO PELA TÉCNICA ELISA DEMONSTRANDO O AUMENTO DA REATIVIDADE A CADA CICLO DE SELEÇÃO (B) - ABSORBÂNCIA OBTIDA DE CADA CICLO DE SELEÇÃO EMPREGANDO-SE O TESTE ELISA. Uma placa para ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL de anti-fago e incubada com fagos ( $10^9$ /cavidade) dos ciclos I, II, III, IV. Posteriormente se adicionou anticorpos anti- *L. braziliensis*. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica, conjugada à peroxidase e com OPD como cromógeno. C: controle (Fago silvestre).

TABELA 2 - FAGOS DE ENTRADA E SAÍDA OBTIDOS DA BIOSSELEÇÃO POR *PHAGE DISPLAY* COM ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS

Ciclos de seleção	Fagos de entrada (UFC)	Fagos de saída (UFC)	% de fagos ligados ( $\times 10^{-2}$ )	Enriquecimento
1	$2,9 \cdot 10^{11}$	$3,6 \cdot 10^5$	0,012	
2	$2,0 \cdot 10^{11}$	$3,8 \cdot 10^7$	1,900	153,2 X
3	$2,0 \cdot 10^{11}$	$6,6 \cdot 10^7$	3,300	266,1 X
4	$2,0 \cdot 10^{11}$	$9,8 \cdot 10^7$	4,900	395,2 X

Nota: UFC: Unidade formadora de colônias de fagos incubados com anticorpos.

### 3.5 SELEÇÃO DOS CLONES

Foi escolhido o quarto ciclo de seleção para infectar uma cultura de *E. coli* e obter-se colônias isoladas em placa contendo meio LB. Cada clone foi testado por ELISA usando o sobrenadante da cultura e soro de pacientes com alta absorbância (acima de 0,5) (FIGURA 11). Desta forma, 428 clones foram testados. Desses, 36 foram reativos frente a soros de pacientes portadores de LTA. Os fagos foram testados também com *pool* de soros com absorbâncias de 0,2 e 0,3 no teste ELISA com o AS, porém os resultados não possibilitaram a diferenciação dos testes positivos e negativos e por isso os estudos com estes soros foram interrompidos.

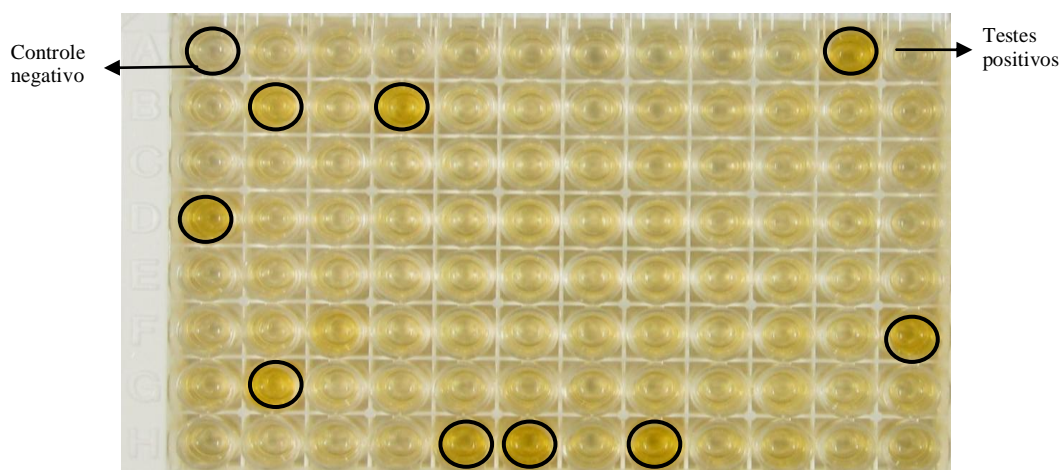


FIGURA 11 - TESTE ELISA PARA SELEÇÃO DOS FAGOS FRENTE A SOROS DE PACIENTES PORTADORES ANTICORPOS ANTI-*Leishmania*. Placa com 95 primeiros sobrenadantes de clones selecionados. ELISA utilizando *pool* de soro de 15 pacientes positivos na diluição de 1:100 e conjugado 1:10.000. O poço A1 representa o soro controle negativo e os demais poços circutados representam fagos positivos selecionados.

### 3.6 OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS

Três sequências peptídicas diferentes foram obtidas e estão apresentadas na TABELA 3. As sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank para verificar homologia com proteínas de *Leishmania* sp.

Observou-se que os peptídeos 1, 2 e 3 alinhavam-se com proteínas de *Leishmania* sp. conforme demonstrado nas TABELAS 4, 5 e 6.

TABELA 3 - SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEOS OBTIDAS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY PARTINDO DE IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICAS PARA *Leishmania* sp.

	Sequências	Massa esperada*	Massa obtida*	Nº de aa
Peptídeo 1	G H $\beta$ M P $\beta$ T S V S $\beta$ L A R P	1931,031 Da	1931,059 Da	15
Peptídeo 2	T $\beta$ V P K E P $\beta$ P L S G $\beta$ R K	2021,124 Da	2021,203 Da	15
Peptídeo 3	S $\beta$ P Q P N N F $\beta$ L N S L G $\beta$	1985,048 Da	1985,121 Da	15

\*Massa esperada: sugerido após submissão das sequências ao *Proteomics Tools*

\*Massa obtida: valores obtidos após análise do peptídeos sintetizados por espectrometria de massa

TABELA 4 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 1 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank

PROTEÍNA	ACESSO	SIMILARIDADE
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania donovani</i>	XP_003859913.1	80%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania donovani</i>	XP_003859429.1	73%
GP63, leishmanolisina de <i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	XP_001562817.1	73%
GP63, leishmanolisina de <i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	XP_001562936.1	60%
Glicoproteína principal de superfície de <i>Leishmania guyanensis</i>	AAA29243.1	60%

TABELA 5 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 2 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank

PROTEÍNA	ACESSO	SIMILARIDADE
Proteína hipotética conservada de <i>L. braziliensis</i> - MHOM/BR/75/M2904	XP_001566726.1	100%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania infantum</i>	XP_001463525.2	100%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania mexicana</i> - MHOM/GT/2001/U1103	XP_003874953.1	86%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania major</i> - cepa Friedlin	XP_001681937.1	67%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania donovani</i>	<u>XP_003859467.1</u>	60%

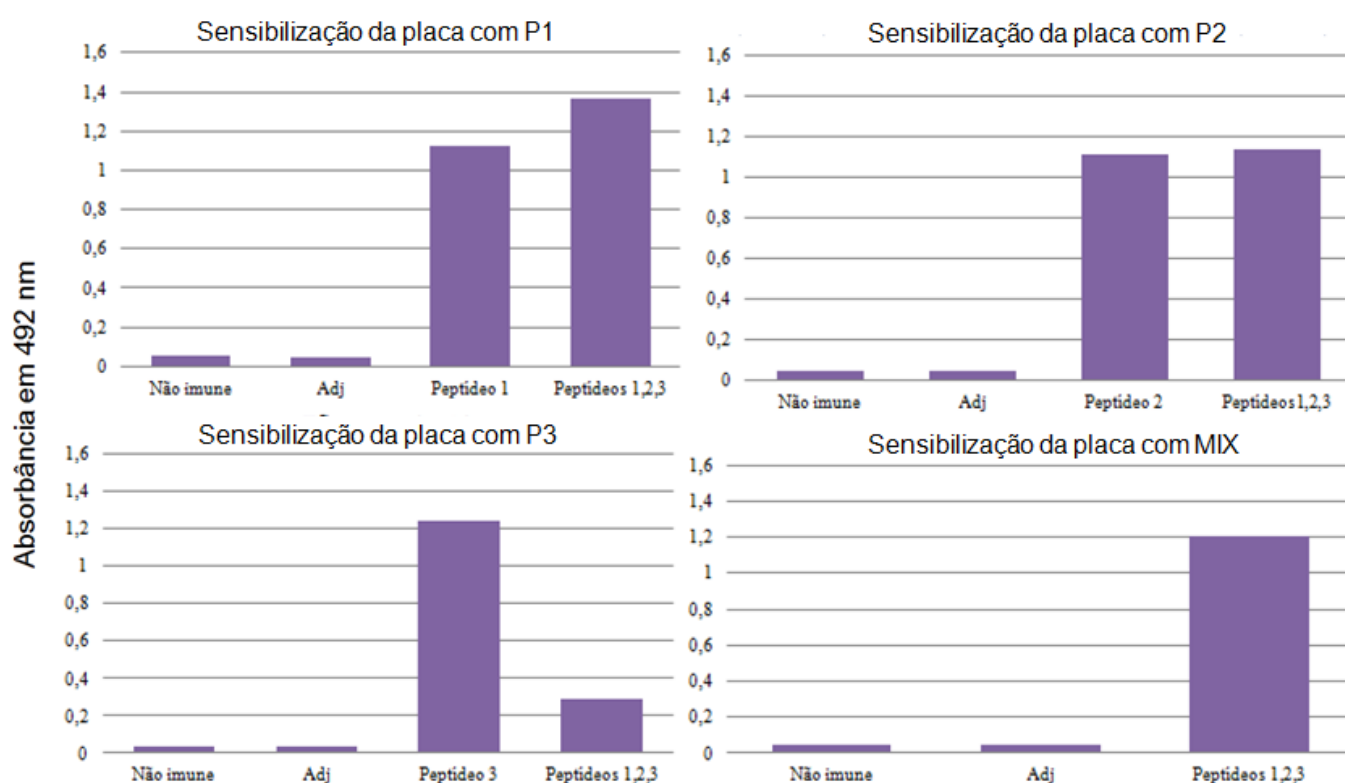
TABELA 6 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 3 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank

PROTEÍNA	ACESSO	SIMILARIDADE
<i>Subunidade alfa do coatômero pontual</i> - <i>Leishmania major</i> cepa Friedlin	XP_001686538.1	100%
<i>Quinase 1 de alvo pontual de rapamicina</i> - <i>L. braziliensis</i> - MHOM/BR/75/M2904	XP_001569274.2	100%
Proteína hipotética conservada de - <i>L. braziliensis</i> - MHOM/BR/75/M2904	XP_001562100	100%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania mexicana</i> - MHOM/GT/2001/U1103	XP_003877650.1	88%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania mexicana</i> - MHOM/GT/2001/U103	XP_003875078.1	62%

### 3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-PEPTÍDEOS

Para avaliar a presença de anticorpos específicos anti-peptídeos, o soro dos hamsters imunizados com peptídeos foram avaliados por ELISA (FIGURA 12).

Todos os animais que foram imunizados com peptídeos apresentaram reatividade frente aos peptídeos 1, 2 e 3 isoladamente e frente ao *pool* dos peptídeos. Os peptídeos 1 e 2 isoladamente induziram reatividade igual ou próxima ao do MIX de peptídeos. Já em relação aos hamsters imunizados com o peptídeo 3, observa-se que estes tiveram maior reatividade frente ao MIX de peptídeos presentes na placa de ELISA. Os animais não imunizados e os que receberam apenas adjuvante não produziram anticorpos contra os peptídeos.



**FIGURA 12 - PRODUÇÃO DE IgG NO SORO DE HAMSTERS IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO 1, 2, 3 OU COM UM MIX DOS TRÊS PEPTÍDEOS POR ELISA.** Não imune: Foi adicionado soro do grupo de animais que não receberam imunizações, Adj: Foi adicionado soro do grupo de animais que recebeu imunizações somente com adjuvante, P1: Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com o peptídeo 1 e adjuvante, P2: Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com o peptídeo 2 e adjuvante, P3: Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com o peptídeo 3 e adjuvante, Pep 1, 2, 3 (MIX): Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com os peptídeos 1, 2, 3 e adjuvante. A sensibilização das placas de ELISA foi realizada com 0,2 µg/ml dos peptídeos 1, 2, 3 ou com o MIX dos três. Foram aplicadas amostras de soro de hamsters dos diferentes grupos experimentais, na diluição 1:50 (*pool* dos dez animais de cada grupo). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG total de hamster ligada a peroxidase (200 ng/mL) e OPD como cromógeno.



### 3.8 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR HAMSTERS FRENTE AO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L. braziliensis*

Após a realização da técnica *Western Blotting*, utilizando como antígenos o AS de *L. braziliensis* e soro de hamsters imunizados com peptídeos, foi possível constatar reatividade dos antígenos frente aos anticorpos dos animais imunizados com os peptídeos 1, 2, 3 e para o MIX (FIGURA 13). Para os animais que receberam apenas o adjuvante não se verificou reatividade. Os hamsters que receberam o peptídeo 1 produziram anticorpos que reconheceram proteínas entre 76 e 150 kDa. Já o soro dos hamsters que receberam peptídeos 2 e 3 produziram anticorpos que reagiram com proteínas com massa entre 52 e 76 kDa de *L. braziliensis*, assim como o MIX dos peptídeos 1, 2 e 3. Os soros dos animais que não receberam os peptídeos (controles negativos) não reagiram frente aos antígenos de *L. braziliensis*.

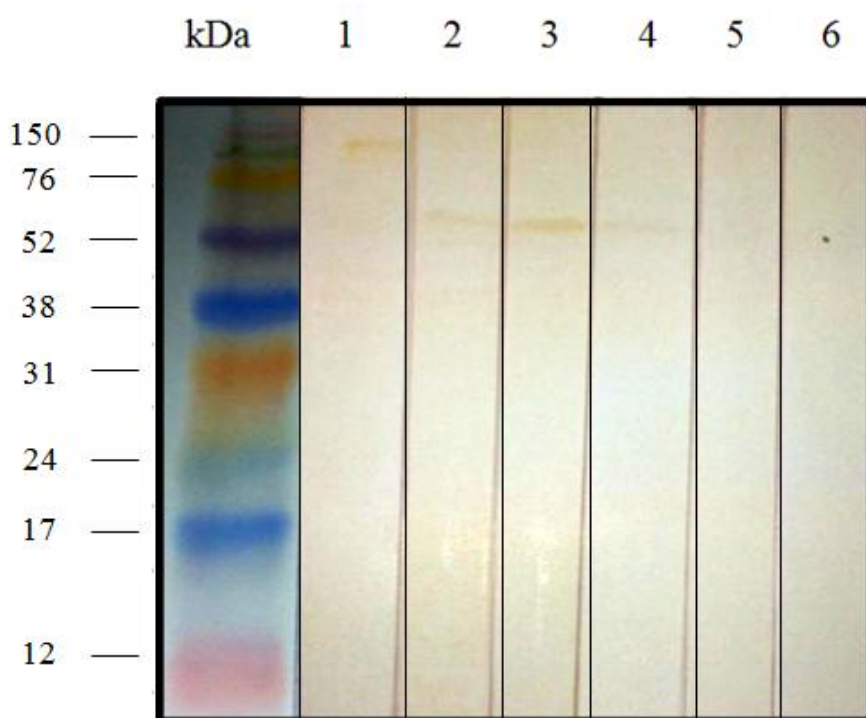


FIGURA 13 – REATIVIDADE DE IgGs DE HAMSTERS INOCULADOS COM PEPTÍDEOS FRENTE A ANTÍGENOS DE *L. braziliensis* por *WESTERN BLOTTING*. Trinta microgramas de antígeno de *L. braziliensis* foram separados por SDS-PAGE a 15% e após *Western Blotting* reagidos com soro de hamster diluído 1:100 (*pool* de soro hamster que recebeu peptídeo 1 na canaleta 1, peptídeo 2 na canaleta 2, peptídeos 3 na canaleta 3, MIX dos três peptídeos na canaleta 4, na canaleta 5 foi adicionado o soro dos hamsters que receberam somente adjuvante e na canaleta 6 o soro dos hamsters que não receberam nenhuma inoculação). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de hamster conjugada à peroxidase (100 µg/mL).

## 4 DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos demonstra que a metodologia selecionada para a realização desta pesquisa (técnica de *Phage display*) foi adequada, visto que sequências peptídicas com homologia aos principais fatores de virulência de *Leishmania* sp. foram obtidas. Além disso, estas sequências demonstraram ser imunogênicas em modelos experimentais para leishmaniose e anticorpos anti-peptídeos reconheceram antígenos de *L. braziliensis*. Dessa forma, esses peptídeos são promissores para detecção de anticorpos em testes diagnósticos e estudos de imunoproteção.

A técnica de SDS-PAGE utilizando antígeno solúvel de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* permitiu evidenciar as variações dos perfis proteicos entre as duas espécies de micro-organismos. Verificou-se que existem diferenças no perfil proteico entre as duas espécies de *Leishmania* já que as bandas observadas não se apresentam de maneira idêntica no gel.

A precipitação das imunoglobulinas de pacientes portadores LTA com solução de sulfato de amônio possibilitou a retirada de albumina do soro humano, conforme esperado. A albumina é a proteína mais abundante no plasma humano e corresponde cerca de 60% da concentração total de proteínas, o que implicaria em reações inespecíficas e de falsos exames positivos (NELSON e COX, 2011).

Para separar anticorpos do tipo IgGs utilizou-se a técnica de cromatografia de afinidade com proteína G, um polipeptídeo de 42 kDa isolado do *Staphylococcus aureus*, ligado a esferas de agarose. A proteína G se liga fortemente à região Fc das imunoglobulinas de várias espécies. Esta propriedade foi muito útil para separar imunoglobulinas do tipo IgG de pacientes com LTA. As IgGs totais foram posteriormente purificadas e concentradas por afinidade usando antígenos de *L. braziliensis* imobilizados em membrana. A purificação de IgGs específicas para *L. braziliensis* foi uma etapa essencial para a realização da técnica de *Phage display* visando selecionar epítomos específicos para essa espécie.

Antígenos produzidos a partir do AS de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram reconhecidos IgGs totais e IgGs purificadas provenientes de pacientes portadores de LTA por *Western blotting*. Esses resultados indicam que o processo de purificação das imunoglobulinas foi bem sucedido. A reação cruzada entre as duas espécies de *Leishmania* estudadas foi constatada, demonstrando que antígenos são

compartilhados entre as espécies estudadas. Além disso, embora as reações antígeno-anticorpo sejam altamente específicas, em alguns casos, o anticorpo induzido por um antígeno pode reagir de maneira cruzada com outro antígeno não relacionado. Esta reatividade cruzada ocorre quando dois antígenos diferentes compartilham um epítopo idêntico que possui propriedades químicas similares (GOLDSBY, KINDT, OSBORN, 2008). No presente trabalho, em se tratando de parasitos do mesmo gênero, era esperada a existência do compartilhamento de epítopos. Esse é um dos principais entraves para o desenvolvimento de imunodiagnósticos de doenças infecciosas causadas por parasitos filogeneticamente próximos.

Na etapa da técnica de *Phage display*, observou-se aumento progressivo da intensidade de reação das partículas virais frente às IgGs específicas do primeiro para o quarto ciclos de seleção (*panning*) por ELISA. Já o número de fagos eluídos foi sempre menor que a quantidade incubada, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados no tubo ficaram ligados a estes pela interação específica destas moléculas.

O trabalho de seleção de clones é exaustivo e buscam-se aqueles que têm maior reatividade para a continuidade das escolhas de antígenos. Assim, apesar de muitos clones serem testados, 36 foram reativos. Em relação aos clones que não foram reativos deve-se considerar que o peptídeo pode ter alteração em sua conformação, perdendo assim, a capacidade de reconhecimento pelos anticorpos presente nos soros. Ainda, postula-se que a presença de proteínas do capsídeo do fago seja importante para interação antígeno com o anticorpo.

Fumagali e colaboradores (2008), utilizando a técnica de *Phage display* selecionaram peptídeos utilizando IgGs purificadas do soro de cães com leishmaniose visceral. Dos 190 clones de fagos testados, os autores selecionaram 25 que foram reagentes frente a soro contendo IgG anti- *L. amazonensis*. De maneira similar ao encontrado em nosso trabalho, os pesquisadores também obtiveram três peptídeos que puderam ser sintetizados e testados.

Peixoto (2011), utilizando a tecnologia de *Phage display*, obteve 49 fagos reagentes, dos quais 38 tiveram seus DNAs sequenciados e 19 peptídeos tiveram identidade com sequências alvo pesquisadas.

Alban (2011) após realização da metodologia em questão obtiveram 724 clones analisados, sendo que 70 mostraram reconhecimento frente a IgGs e sete sequências peptídicas foram encontradas.

Observa-se desta forma que o número de peptídeos obtidos ao final dos experimentos que utilizam a técnica de *Phage display* para pesquisa de sequências peptídicas difere entre os experimentos realizados, o que pode estar relacionado ao número de Unidades Formadoras de Colônias testadas, tipo de bibliotecas de fagos e ao parasito em estudo.

Os protozoários do gênero *Leishmania* desenvolveram formas sofisticadas para escapar à resposta imune inata, permitindo sua infecção e multiplicação dentro dos macrófagos do hospedeiro mamífero. As duas moléculas mais abundantes de superfície dos promastigotas estão implicadas na sua virulência: a GP63 e o LPG.

Os três peptídeos descritos nesse estudo revelaram a homologia a LPG (Lipofosfoglicana), GP63 (Leishmanolisina ou glicoproteína de 63 kDa), bem como com outras proteínas hipotéticas de *Leishmania* sp. quando comparadas com outras depositadas no GenBank.

Modelos experimentais que utilizaram-se da inoculação de cepas de *L. major* mutantes que não expressavam as moléculas GP63 ou LPG, mostraram redução na virulência de *Leishmania*, indicando importância destas moléculas no estabelecimento da infecção (JOSHI *et al.*, 2002). Resultados incompatíveis a esta descoberta foram apresentados por Ilg e colaboradores (2001), quando ficou demonstrado que cepas de *L. mexicana* mutantes sem expressão de LPG cresciam em cultura da mesma forma que cepas selvagens.

Ainda assim, a grande maioria dos estudos apontam o LPG um dos fatores de virulência e infectividade mais importantes da *Leishmania*, como discutido a seguir. No início da infecção por *Leishmania* sp. a molécula de LPG seria responsável por inibir a fusão do fagossomo (contendo o parasito) com os lisossomos (contendo enzimas líticas). Enquanto que a GP63 ficaria responsável por inativar as enzimas do lisossomo, caso a fusão com o fagossomo ocorresse (DERMINE *et al.*, 2000).

O LPG é encontrado na superfície de promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* descritas (TURCO *et al.*, 2001). Foi demonstrado também que o LPG é capaz de proteger formas promastigotas de elevações transitórias nos níveis de espécies reativas de oxigênio, geradas durante a fagocitose, o que representa um

importante mecanismo de fuga do sistema imune do hospedeiro (SPATH *et al.*, 2003).

Outra estratégia importante para o desenvolvimento da infecção é que as formas amastigotas possuem a capacidade de adaptar-se ao meio ácido dos fagolisossomos e que são metabolicamente mais ativos em ambiente ácido do que neutro (McCONVILLE *et al.*, 2007; NADERER e McCONVILLE, 2008).

Vários fatores de virulência de *Leishmania* sp. já foram identificados, sendo que a GP63 é referida como maior glicoproteína de superfície da forma promastigota de *Leishmania* sp. Ela representa mais de 1% da proteína total do parasito. Esta molécula está intimamente relacionada com a resistência do parasito durante a fase de infecção e foi um dos primeiros antígenos definidos e testados como vacina contra a leishmaniose (YAO *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que a GP63 possui também a capacidade de ligar-se à componentes do sistema complemento quebrando essas moléculas e tornando-as inativas. Esta característica parece proporcionar proteção aos promastigotas contra a resposta imune inata do hospedeiro (CHAUDHURI; CHANG, 1988).

Além disso, a glicoproteína de 63 kDa de *Leishmania* sp. é capaz de bloquear a degradação de peptídeos, necessária para o crescimento e proteção dos amastigotas dentro das células dos macrófagos (YAO *et al.*, 2003).

A evasão do sistema imune é uma estratégia eficaz de sobrevivência dos parasitos. Em relação à resposta imune, verificou-se que a GP63 influencia a atuação dos linfócitos TCD4 reduzindo a resposta imune mediada por células (HEY *et al.*, 1994). Esta glicoproteína também cliva peptídeos intracelulares, prevenindo a apresentação de antígenos e inibindo a quimiotaxia dos macrófagos (GARCIA *et al.*, 1997). Além disso, a GP63 foi empregada em estudo de imunização experimental contra diferentes espécies de *Leishmania* e tem conferido proteção efetiva em camundongos suscetíveis (JAAFARI *et al.*, 2007). No entanto, outras espécies animais também susceptíveis à infecção por *Leishmania*, não desenvolveram resposta imune protetora quando estimulados por diferentes formulações contendo esta glicoproteína (OLOBO *et al.*, 1995; RODRÍGUEZ-CORTÉS *et al.*, 2007). Estudos continuam sendo conduzidos para estudar a melhor formulação e administração desta molécula para que se possa conferir imunoproteção a animais e assim utilizá-la como vacina contra leishmanioses.

Foi demonstrada a capacidade de produção de anticorpos específicos anti-peptídeos em hamsters imunizados com os peptídeos obtidos no presente trabalho. Esta informação é de suma importância, visto que somente moléculas imunogênicas são capazes de gerar anticorpos específicos e como os três peptídeos possuem esta propriedade poderiam ser úteis como ferramentas de imunizações bem como em outras estratégias imunológicas. Embora todas as moléculas que tenham imunogenicidade (capacidade de produzir resposta imune humoral e/ou celular) também tenham a propriedade de antigenicidade (capacidade de se combinar com anticorpos e/ou receptores de superfície celular) o inverso não é verdadeiro. Algumas moléculas pequenas, denominadas haptenos, são antigênicas e são incapazes, por si próprias, de induzir uma resposta imune específica, pois lhes falta imunogenicidade (GOLDSBY, KINDT, OSBORN, 2008). No caso dos peptídeos avaliados neste trabalho, constatou-se que pelo tamanho molecular (os melhores imunógenos tendem a ter massa de aproximadamente 100.000 Da) tratava-se de haptenos e por este motivo as moléculas foram acopladas ao KLH, para juntos tornarem-se imunogênicos.

Os adjuvantes utilizados atuaram prevenindo os peptídeos de serem rapidamente dispersos e degradados, provendo ao sistema imune um estímulo localizado, persistente e a inflamação. Outra estratégia promissora na estrutura de vacinas a ser testada consiste em administrar, juntamente com os peptídeos, citocinas que vão direcionar a resposta imune para o tipo Th1 ou Th2 que melhor favoreça a proteção contra determinado patógeno (ROITT, 2013).

A realização da técnica *Western blotting* demonstrou a ligação dos anticorpos IgG dos animais imunizados com peptídeos frente ao antígeno bruto de *L. braziliensis* revelando que a técnica empregada é útil na identificação de possíveis alvos antigênicos para pesquisas de diagnóstico e ou imunoprevenção da leishmaniose.

As bandas encontradas revelaram que os anticorpos produzidos pelos hamsters reconheceram bandas proteicas entre 76 e 150 kDa e entre 52 e 76 kDa de *L. braziliensis*.

Nascimento e colaboradores (1990) avaliaram o soro de indivíduos vacinados com cepas de *Leishmania* sp. que reconheceram oito principais bandas com massas moleculares estimadas em 13,5, 25, 40, 63, 73, 85, 97 e 160 kDa. Fica evidente que

os antígenos *L. braziliensis* além de serem moléculas complexas apresentam variadas massas moleculares.

Os peptídeos obtidos no presente estudo possuem homologia com fatores de virulência de *Leishmania* sp. Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que os micro-organismos utilizam para “driblar” o sistema de defesa do hospedeiro e iniciar uma infecção. Postula-se que a inoculação prévia destes fatores de virulência poderiam desarticular o curso de uma futura infecção e desta forma estas moléculas poderiam ser utilizadas em estratégias de imunoprofilaxia. Acredita-se também que os peptídeos sintéticos obtidos sejam úteis para a investigação de novos métodos diagnósticos sorológicos da LTA, já que é provável que muitos dos anticorpos gerados por pacientes sejam direcionados para estes fragmentos.

## 5 CONCLUSÕES

A técnica de *Phage display* foi adequada para a realização da pesquisa, visto que possibilitou a seleção de clones de bacteriófagos reativos com anticorpos IgGs purificados de pacientes com LTA.

Sequências peptídicas com homologia aos principais fatores de virulência de *Leishmania* sp. foram obtidas. Estas sequencias poderão ser úteis em estratégias de imunoprevenção e na investigação de novos métodos de diagnósticos sorológicos da LTA.

Sequências peptídicas injetadas em hamsters demonstraram ser imunogênicas e anticorpos anti-peptídeos de hamster reconheceram antígenos do AS de *L. braziliensis*.



## 6 PERSPECTIVAS

Anticorpos anti-peptídeos foram produzidos por Hamsters golden imunizados e, de posse destes soros, torna-se possível a realização da eletroforese 2D para identificação dos antígenos originais de *Leishmania* sp. Esta eletroforese revelaria os *spots* de massa molecular dos antígenos que poderiam ser comparadas as massas obtidas no *Western Blotting*.

Hamsters poderão ser imunizados com os peptídeos aqui descritos e os soros anti-peptídeos obtidos poderão ser testados novamente, com a diferença de que, neste novo experimento, serão avaliados, por *Western blotting*, antígenos de outras espécies de *Leishmania*, visando demonstrar a possível utilização destas moléculas com antígenos para o diagnóstico de outras formas clínicas de leishmaniose e da doença causada por outras espécies (além de *Leishmania braziliensis*).

## REFERÊNCIAS

ALBAN, S. M. **Uso de peptídeos para o diagnóstico imunológico da hanseníase.** Tese (Curso de Pós-Graduação em Processos biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

AUTRAN, B. *et al.* Therapeutic vaccines for chronic infections. **Science**, v. 305, n. 5681 p. 205-208, jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2010.

BRADFORD, M. M. a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (GP63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 27, p. 43–52, jan. 1988.

DERMINE, J. F. *et al.* *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 115-126, dec. 2000.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, sept. 2004.

FARGEAS, C. *et al.* Synthetic Peptide-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 241-248, feb. 1996.

FUMAGALLI, M. A. C. **Proteção contra a infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *Phage display* e *spot synthesis*.** 85 f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

GAMBOA, D. K. *et al.* Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. **Parasitology**, v. 135, p. 319-326, mar. 2008.

GARCIA, M. R. *et al.* Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidase (s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 4, p. 1005-1013, apr. 1997.

GOLDSBY, T. P.; KINDT, T.; OSBORN, B. *Imunologia de kuby*. Editora Artmed, 6a edição, 2008.

HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 726, 1988.

HEY, A. S. *et al.* The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 9, p. 4542- 4548, may 1994.

ILG, T.; DEMAR, M.; HARBECKE, D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 4988-4997, feb. 2001.

JAAFARI, M. R. *et al.* The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. **Vaccine**, v. 25, p.6107, aug. 2007.

JOSHI, P. B. *et al.* Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (gp63) as a virulence factor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 33-40, mar. 2002.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate techniques**. USA:Academic, 785p., 1996.

KUMAR, S. *et al.* Identification and Characterization of a Novel *Leishmania donovani* Antigen for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 601-605, apr. 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, aug. 1970.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, nov. 1951.

McCONVILLE, M. J. *et al.* Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 8, p. 368-375, jul. 2007.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.32, p. 221-96, 1965.

NADERER, T.; McCONVILLE, M. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301-308, feb. 2008.

NASCIMENTO, *et al.* Vaccination of Humans against Cutaneous Leishmaniasis: Cellular and Humoral Immune Responses. **Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2198-2203, jul. 1990.

OLIVEIRA, S. G. G. *et al.* Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, dec. 2011.

OLOBO, J. O. *et al.* Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniosis using recombinant *Leishmania* 'major surface glycoprotein' (gp63). **Veterinary Parasitology**, v. 60, p.199-212, dec. 1995.

PARMLEY, S. F e SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v.73, n.2, p. 305-318, dec. 1988.

PEIXOTO, J. **Tecnologia de *Phage display* para obtenção de antígenos sintéticos e utilização no diagnóstico e imunoproteção da cisticercose.** Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. *et al.* Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v.14; 25, n. 46, p. 7971-7962, aug. 2007.

ROITT, I. M. Fundamentos de Imunologia - Editora: Guanabara Koogan, 12<sup>a</sup> ed. 2013.

SPATH, G. F. *et al.* The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, jul. 2003.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, feb. 2009.

TURCO, S. J.; SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v. 17, n.5, p. 223-226, may 2001.

YAO, C. *et al.* The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16, nov. 2003.

## CAPÍTULO 2

### Peptídeos sintéticos no imunodiagnóstico da leishmaniose tegumentar americana

#### RESUMO

O diagnóstico das leishmanioses, além de critérios clínicos e epidemiológicos, necessita de confirmação com resultados laboratoriais. A demonstração do parasito em amostras de tecido ou o seu crescimento em meios de cultura constituem o padrão ouro para diagnóstico das leishmanioses. Porém, estas técnicas apresentam limitações, tanto pela baixa sensibilidade em determinadas fases da doença como pelas dificuldades operacionais para obtenção e análise do material. O ensaio imuno-enzimático (ELISA) é considerado um teste rápido, sensível e facilmente automatizável. Estudos visando o aprimoramento desta metodologia e empregando antígenos purificados vem sendo desenvolvidos para que se possa obter de forma segura e eficaz o diagnóstico desta doença. No presente estudo, três peptídeos (P-1, P-2 e P-3) identificados por *Phage display* e sintetizados quimicamente foram avaliados quanto à capacidade de detectar anticorpos contra *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) por teste ELISA indireto. Para obtenção do ponto de corte (*Cut-off*) entre soros positivos e negativos dois cálculos foram aplicados. O primeiro foi realizado calculando a média das absorbâncias obtidas para um grupo de indivíduos considerados negativos acrescidos de dois desvios padrão (2SD) e o segundo foi empregando a Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*). Dois grupos de pacientes foram investigados, sendo o primeiro constituído por 25 indivíduos que tiveram diagnóstico parasitológico confirmado e o segundo por 57 pacientes que apresentavam suspeita clínica de LTA, eram moradores de área endêmica e que tinham teste sorológico positivo para a doença. Os três peptídeos e o MIX dos mesmos (P-1+P-2+P-3) foram imunorreativos com o soro de pacientes dos dois grupos. Em pacientes do Grupo 2 os três peptídeos só ou em combinação foram capazes de diagnosticar de 82 e 84% dos indivíduos. O peptídeo 1, 2, 3, MIX e AS reagiram com 64, 56, 44/56, 40/72 e 80% das amostras de soro, respectivamente. As sensibilidades do teste ELISA foram de 64 a 74% para o peptídeo 1, 56 a 65% para o peptídeo 2, 44 a 68% para o peptídeo 3, 40 a 79% para o MIX e de 80 e 91% para o AS. O MIX de peptídeos apresentou o melhor desempenho (79% de sensibilidade) seguido do P-1 (74%). A aplicação do teste t sugeriu que o P-1 seria melhor alternativa entre os peptídeos para o diagnóstico da LTA. As especificidades dos antígenos variaram de 92 a 100% demonstrando a habilidade destes em diagnosticar corretamente os indivíduos sadios. Reações cruzadas com soros de pacientes com doença de chagas, hanseníase e tuberculose foram avaliadas contra todos os antígenos. A reação cruzada com doença de chagas foi zero para o P-1 enquanto que para o AS foi 60%. Estas moléculas revelaram grande importância como novos alvos biológicos e com potencial para o diagnóstico e consequentemente tratamento precoce de indivíduos com LTA.

Palavras-chave: leishmaniose. Imunodiagnóstico. ELISA indireto. Peptídeos sintéticos. *Biopanning*.

## CHAPTER 2

### Synthetic peptides in immunodiagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

#### ABSTRACT

The diagnosis of Leishmaniasis, apart from the clinical and epidemiological criteria, needs laboratorial confirmation. The demonstration of the parasite in tissue samples or their growth in culture media is the *golden* standard for diagnosis of Leishmaniasis. However, these techniques have limitations, both the low sensitivity at certain stages of the disease as the operational difficulties in obtaining and analyzing the material. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered a rapid, sensitive and easily automatable test. Studies aiming at the improvement of the methodology and using purified antigens have been developed in order to get a safe and effective way to diagnose the disease. In this study, three peptides (P-1, P-2 and P-3) identified by *Phage display* were chemically synthesized and evaluated for their ability to detect antibodies against *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) of patients with Cutaneous Leishmaniasis (ACL) by indirect ELISA. In order to obtain the *cut-off* between positive and negative sera, two calculations were applied. The first one was conducted by calculating the mean absorbance obtained for a group of individuals considered negative plus two standard deviations (2SD). The second calculation was using the ROC curve (Receiver Operating Characteristics). Two groups of patients were studied: the first consists of 25 individuals who had confirmed parasitological diagnosis and the second group of 57 patients who had clinical suspicion of CL and were residents of an endemic area and also had positive serologic test for the disease. The three peptides and the MIX (P-1+P-2+P-3) were immunoreactive against sera of patients in both groups and, in Group 2, the three peptides alone or in combination were able to diagnose 82 to 84% of individuals. Peptide 1, 2, 3, MIX and AS were reactive with 64, 56, 44/56, 40/72 and 80% sera samples, respectively. The sensitivity of the ELISA assay using the peptides were 64 to 74% for peptide 1, 56 to 65% for peptide 2, 44 to 68% for peptide 3, 40 to 78% for the MIX and 80% to 91% for the AS. The MIX of peptides showed the best performance (79%) among the peptides followed by P-1 (74%). The application of the t-test suggested that P-1 was the best alternative among the peptides for the diagnosis of ACL. The specificities of antigens ranged from 92% to 100% demonstrating the ability to correctly diagnose the healthy individuals. Cross-reactions with sera from patients with Chagas Disease, Leprosy and Tuberculosis were evaluated against all antigens. Cross-reactivity with Chagas Disease was zero for the P-1 and 60% for AS. These molecules have shown great importance as new biological targets and with potential for the diagnosis and subsequent early treatment of patients with ACL.

Key words: Leishmaniasis. Immunodiagnosis. Indirect ELISA. Synthetic peptides. Biopanning.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses são doenças negligenciadas, que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (OMS, 2010).

A leishmaniose tegumentar (LT) é encontrada em todos os continentes, porém, representa grave problema de saúde pública nas Américas, Europa, África e Ásia com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos (OMS, 2010).

O diagnóstico laboratorial da LT consiste em:

1: **exames parasitológicos** (demonstração direta do parasito, isolamento em meio de cultura ou em animais de laboratório) que demonstram sensibilidades variadas dependendo da fase da doença e ainda apresentam desvantagens operacionais em áreas endêmicas, uma vez que a infra-estrutura pode ser bastante deficitária nessas regiões (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000; LACHAUD *et al.*, 2000).

2: **pesquisa de material genético do parasito** por técnicas moleculares como, por exemplo, o exame de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) que permite amplificar em escala exponencial uma determinada sequência de DNA. Esta metodologia apresenta sensibilidades de 82 a 98% e especificidades de 95 e 100%. No entanto, existem dificuldades para implantação deste exame no serviço público pelos elevados custos associados à realização desta técnica e pela necessidade de equipamento apropriado. Assim, esta reação tem sido mais utilizada para fins de pesquisa, sendo pouco disponível na rotina diagnóstica no país (NUZUM *et al.*, 1995; GONTIJO, 1997; LACHAUD *et al.*, 2000; BRASIL, 2010).

3: **testes imunológicos** que são métodos indiretos e incluem intradermorreação (IDR), ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação entre outros.

Entre os métodos imunológicos, o teste intradérmico é um método simples que consiste na avaliação da hipersensibilidade tardia de pacientes com leishmaniose. O antígeno de Montenegro utilizado no teste é obtido a partir de promastigotas em suspensão. A produção foi desenvolvida inicialmente por Montenegro, em 1926, e modificada por Sales-Gomes em 1939. A técnica é empregada como valioso recurso



no diagnóstico imunológico da LTA, dada sua sensibilidade (86,4 a 97,5%) (MELO *et al.*, 1977; MARZOCHI, 1980). No entanto, o teste de Montenegro apresenta limitações já que sua positividade pode ser interpretada como exposição ao parasito sem doença, alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças. O resultado também pode ser positivo após o tratamento. Em área endêmicas, podem ser encontradas de 20 a 30% de pessoas sadias com reação positiva (MARZOCHI, 1980; GUERRA *et al.*, 1985; BRASIL, 2010).

O teste de Imunofluorescência Indireta usa formas promastigotas e apresenta sensibilidade estimada em 80% podendo alcançar 100% na forma mucosa, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa. No entanto este valor pode sofrer alterações dependendo do técnico que realiza a leitura. A IFI não é facilmente adaptável a estudos soroepidemiológicos de grande escala devido às limitações de disponibilidade de parasitas e microscópios de fluorescência (MARZOCHI, 1980; MENDOÇA *et al.*, 1988; RODRIGUES, 2000).

O ensaio imuno-enzimático (ELISA), utilizando antígeno solúvel apresenta alta sensibilidade (92 e 95%) e especificidade (92 e 100%). Por tratar-se de um método facilmente automatizável ele tem potencial para ser aplicado nos diagnósticos individuais e epidemiológicos de LTA, permitindo assim seu emprego em diagnóstico de larga escala (RYAN *et al.*, 2002; SZARGIKI *et al.*, 2009).

Uma segunda geração de antígenos vem sendo pesquisada para facilitar a industrialização da produção e a reprodutibilidade dos testes. Os antígenos recombinantes tiveram seus estudos iniciados nos anos 90 (FARGEAS *et al.*, 1996; PASSOS *et al.*, 2005; PORROZZI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013).

Avanços biotecnológicos têm contribuído para o desenvolvimento de antígenos mais seguros e eficazes. Dentro deste contexto, insere-se a pesquisa de mimotopos de antígenos, que se iniciou a partir de 2000, especialmente para as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis* (FUMAGALLI, 2008; FUMAGALLI *et al.*, 2013).

Em relação a *L. braziliensis*, não existem relatos na literatura de seleção de peptídeos utilizando *Phage display*. Essa investigação é importante para atender a demanda de insumos diagnósticos para a doença e assim auxiliar para que o tratamento seja o mais precoce possível visando reduzir sequelas (FUMAGALLI, 2008; KUMAR *et al.*, 2012; FUMAGALLI *et al.*, 2013).

Este trabalho visa, portanto, avaliar peptídeos sintéticos obtidos pela técnica de *Phage display* que possam ser usados no diagnóstico sorológico da LTA causada por *L. braziliensis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS DE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para seres humanos (Protocolo 107/11).

Foram coletadas amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica de LTA para a obtenção de soro (n=198). Os voluntários foram provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e de várias Regionais de Saúde do Estado do Paraná. Dois grupos de pacientes foram formados:

- **grupo 1 (n=25)** indivíduos com clínica, provenientes de zona endêmica e exame parasitológico positivo.
- **grupo 2 (n=57)** indivíduos com clínica, provenientes de zona endêmica e com exame sorológico positivo.

Foram também coletadas amostras de indivíduos saudáveis (n=37) que não apresentaram histórico de leishmaniose ou doença de chagas, moravam em zona indene (livre da doença) e não mantinham contato com pacientes com essas doenças.

Para pesquisa de reação cruzada foram obtidos soros de pacientes com diagnóstico confirmado de doença de chagas (n=10), tuberculose (n=10) e hanseníase (n=10). Todos os soros foram armazenados em alíquotas a -20°C.

### 2.2 CULTURA DO PARASITO PROVENIENTE DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PARA PESQUISA DE *Leishmania braziliensis*

Amostras de biópsia de borda da lesão de pacientes foram recebidas no laboratório de Parasitologia Molecular juntamente com o soro de pacientes com suspeita de LTA. As amostras foram lavadas (2X) em solução fisiológica 0,9% contendo antibiótico (Penicilina 25.000 UI). Após a última lavagem 0,5 mL de soro fisiológico contendo antibiótico foram adicionados e a biópsia foi macerada. O

conteúdo foi distribuído em seis tubos de meio bifásico NNN (Novy-McNeal-Nicolle) e cultivado em estufa a 24°C. O meio líquido era repicado a cada cinco a sete dias para novos tubos e observado em microscópio óptico (250 e 400X) para pesquisa do parasito (CASTRO, 2001).

### 2.3 PREPARO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *Leishmania braziliensis*

Cepas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/Cur22) foram cultivadas em meio bifásico NNN. Após a obtenção de tubos ricos em formas promastigotas, os sobrenadantes foram repassados para garrafas de cultura (100 mL), contendo o meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Rockville, Maryland, USA) a 10%. Após a multiplicação dos parasitos, as formas promastigotas foram recuperadas por filtração em gaze estéril seguido de centrifugação a 3.500 g por 10 minutos a 4°C. Foram realizadas lavagens com solução fisiológica 0,9%, 0,3%, 0,9% e PBS (tampão fosfato-salino) pH 7,2 respectivamente. A recuperação das células foi feita por centrifugações a 3.500 g por 10 minutos a 4°C.

O rompimento dos parasitos foi realizado ressuspendendo-se o sedimento com água destilada esterilizada. Também foram realizados seis ciclos de congelamentos e descongelamentos súbitos imergindo os tubos em nitrogênio líquido até seu congelamento e imediato descongelamento em banho-maria a 37°C. Mantendo os antígenos conservados em banho de gelo foi aplicada a ação do Ultra-Som (Bandelin, Berlim, Alemanha) a 150 W por seis séries de 30 segundos com intervalos de um minuto (SZARGIKI *et al.*, 2009).

O produto resultante foi centrifugado por 30 minutos em ultra-centrífuga a 4°C e 14.000 g. Os sobrenadantes foram recuperados e filtrados em sistema esterilizante (membrana 0,22 µm). Em seguida foi realizada dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). Foram feitas aliquotas dos antígenos produzidos que foram armazenadas em tubos criogênicos a - 20°C.

## 2.4 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY*

Os peptídeos identificados pela técnica de *Phage display* (Conforme capítulo 1) foram sintetizados quimicamente pela estratégia Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonila), utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que usa aminoácidos especiais para a síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à resina. O protocolo foi realizado conforme Merryfiel (1965) e usando o sintetizador de peptídeos automático MultiPep RS (Intavis Bioanalytical, Nattermannallee, Alemanha).

A técnica do ALA (alanina) *scan* foi utilizada para avaliação dos aminoácidos essenciais para o reconhecimento da proteína pelos anticorpos. Este ensaio consiste na síntese de peptídeos onde cada aminoácido da sequência original é substituído por uma alanina. No caso de alaninas presentes na sequência inicial, esta é substituída por uma glicina. A síntese é realizada como descrita na FIGURA 1.



FIGURA 1 - TÉCNICA ALA – SCAN - Alanina é utilizada para substituir os resíduos de aminoácidos em cada posição do peptídeo inicial. A técnica pode ser utilizada para determinar a importância de cada um dos resíduos substituídos em relação a funcionalidade do peptídeo original. Fonte: [http://www.genscript.jp/peptide\\_screening\\_tools.html](http://www.genscript.jp/peptide_screening_tools.html)

## 2.5 AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L. braziliensis* EM TESTE ELISA INDIRETO

Os soros dos pacientes e dos controles negativos foram avaliados por ELISA utilizando-se antígeno solúvel (AS) como antígeno para sensibilização das placas. Foram aplicados 100 µL do AS (500 ng) em tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,16%,  $\text{NaHCO}_3$  0,29%, pH 9,6), por poço e incubação *overnight* a 4°C. Após esta etapa, a solução de antígeno foi descartada e as placas lavadas, por duas vezes, com solução de lavagem ( $\text{NaCl}$  0,9% - Tween 20 0,05%). O bloqueio foi realizado por uma hora a 37°C, adicionando-se 120 µL de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS pH 7,4) por poço. Após incubação, nova lavagem da placa foi realizada. Os soros foram diluídos 1:100 em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05%) adicionados à placa e incubados em estufa a 37°C por uma hora. Após esta etapa, as placas foram novamente lavadas, por quatro vezes, e 100 µL, por poço, do conjugado anti-IgG humana Fc específica diluído 1:10.000 em tampão de incubação foi adicionado e incubado por uma hora a 37°C. Foram realizadas quatro lavagens da placa e o substrato, composto por uma pastilha de OPD (2 mg) diluída em 10 mL de tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% foi aplicado. Após 15 minutos ao abrigo de luz foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

## 2.6 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO TESTE ELISA INDIRETO

A fim de se buscar uma aplicabilidade em imunodiagnósticos, os peptídeos 1 (P-1), 2 (P-2), 3 (P-3) e o MIX destas moléculas (P-1 + P-2 + P-3) identificados pela técnica de *Phage display* (conforme capítulo 1 desta tese), foram empregados como antígenos para sensibilizar placas de 96 poços e avaliados no teste ELISA indireto.

Para padronização do teste ELISA diferentes condições foram testadas, incluindo alterações na concentração dos peptídeos (0,250, 0,5, 1, 2 e 3 µg por poço), no uso de peptídeos isolados ou em MIX, no uso de peptídeos conjugados a

molécula KLH (Keyhole limpet hemocyanin), no uso de peptídeos com ou sem a sequência KKG adicionada a sua estrutura, na solução de bloqueio (com caseína 2% ou com BSA 3% em PBS pH 7,4), na diluição do soro (1:25, 1:50 e 1:100), na concentração do conjugado anti-humano porção Fc específica ligado a biotina (2,5, 1,0 e 0,5 µg/mL), no conjugado anti-IgG-humana Fc específica ligado à peroxidase (1:2.500, 1:5.000 e 1:10.000) e na neutravidina conjugada à peroxidase (12,5, 25, 50, 100 e 200 ng/mL).

Após a determinação da melhor condição a ser utilizada, as placas foram sensibilizadas com o MIX dos peptídeos ou com os peptídeos isolados em tampão carbonato pH 9,6 onde permaneceram *overnight* a 4°C. Após incubação, a solução de sensibilização foi descartada e foi realizada a lavagem por duas vezes com solução de lavagem para remoção de antígenos não ligados. Os poços foram bloqueados com 120 µL de PBS acrescido de BSA 3% por uma hora em temperatura de 37°C. Após incubação e nova lavagem, foram adicionados soros diluídos 1:50 em BSA 3%, PBS pH 7,4 por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada quatro vezes e foi adicionado o conjugado anti-IgG humana Fc específica, ligado a biotina (0,25 µg/mL) por uma hora a 37°C. Após a realização de quatro lavagens para remoção de anticorpos secundários não ligantes, foram adicionados 100 µL de neutravidina ligada a peroxidase (12,5 ng/mL) e foi realizada a incubação das placas por uma hora. Quatro lavagens foram efetuadas seguidas da adição de substrato em 10 mL de tampão citrato e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% foi aplicado onde permaneceram, em ambiente escuro, por 15 minutos. A parada da reação aconteceu com adição de 20 µL de ácido sulfúrico 1:20.

## 2.7 AVALIAÇÃO DO PONTO DE CORTE E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a padronização final dos testes ELISA, a partir das absorbâncias obtidas para as análises dos antígenos P-1, P-2, P-3 e MIX e AS, duas abordagens foram adotadas para a determinação de pontos de corte (*Cut-off*) e definição de soros positivos e negativos.

Na primeira foram calculadas as médias das absorbâncias de um grupo de indivíduos considerados negativos (n=37). A partir desses resultados, os pontos de corte corresponderam às médias acrescidas de dois desvios padrão.

Na segunda abordagem foram empregadas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*) (METZ, 1978; ZWEING, CAMPBELL, 1993). A curva ROC é uma ferramenta estatística avançada para avaliação e comparação dos resultados de testes diagnósticos. Este programa possibilita a avaliação da acurácia global através da Área sob a Curva ROC (Area Under Curve - AUC) e o estudo da sensibilidade e especificidade com vários pontos de corte. Os dados geram uma tabela onde cada ponto de corte impacta na sensibilidade e especificidade. As informações geradas subsidiam a identificação do ponto de corte ideal. Neste caso os pontos de corte foram determinados separadamente para G1 e G2 (os grupos estão descritos no item 2.1).

Após a classificação de cada soro de indivíduo como sendo positivo ou negativo foi possível estimar índices de qualidade como sensibilidade, especificidade e precisão (GALEN e GAMBINO, 1975).

Os cálculos dos valores preditivos positivos e negativos foram realizados considerando-se duas estimativas de prevalência da doença: uma na população geral estudada (6,1%, - dado obtido de CRUZ, 2008) e outra na população de indivíduos com suspeita da doença (28,8%).

Foi estimada a concordância de peptídeo com o AS utilizando-se o coeficiente de Kappa e seguindo o critério proposto por Landis e Koch (1977) para a classificação do resultado (<0,20%: fraca; 0,20 a 0,40%: mínima; 0,40 a 0,60%: regular; 0,60 a 0,80%: bom; >0,80%: excelente).

Para estimar parâmetros de interesse foram construídos intervalos de confiança de 95%. Para a comparação dos peptídeos com o AS, em relação à absorbância, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados com o programa computacional MedCalc 13.2.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 AMOSTRAS DE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS

A amostragem de soros obtidos e utilizadas no presente trabalho foram:

- ❖ 37 soros de indivíduos saudáveis de zona indene
- ❖ 10 soros de pacientes com doença de chagas
- ❖ 10 soros de pacientes com hanseníase
- ❖ 10 soros de pacientes com tuberculose
- ❖ 198 soros de pacientes com suspeita clínica de LTA

#### 3.2 CULTURA DE BIÓPSIAS DE PACIENTES PARA PESQUISA DE *Leishmania braziliensis*

Dos 198 soros de pacientes com suspeita clínica de LTA, 25 foram positivos para cultura de *L. braziliensis* e foram utilizados para compor o **Grupo 1** de estudo.

#### 3.3 AVALIAÇÃO DOS SOROS NO TESTE ELISA INDIRETO UTILIZANDO-SE O ANTÍGENO SOLÚVEL DE *Leishmania braziliensis*

Dos 198 soros 57 foram positivos no teste ELISA indireto inicial utilizando-se o AS como antígeno. Estes pacientes constituíram o **Grupo 2** de estudo.

### 3.4 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO TESTE ELISA INDIRETO

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, foram testadas várias parâmetros experimentais para definir a melhor condição, para a realização do teste ELISA indireto usando peptídeos como antígeno.

Para verificar se os peptídeos identificados seriam reconhecidos pelo soro dos pacientes com LTA (e que não fossem reconhecidos pelo soro de voluntários saudáveis) um teste inicial foi realizado. Para isto foram avaliadas as seguintes condições: MIX dos peptídeos nas concentrações de 0,125 µg, 0,250 µg, 0,5 µg e 1 µg por poço da placa, conjugado anti-IgG humana Fc específica ligado a peroxidase diluído 1:5.000, 1:7.500 e 1:10.000, *pool* de 3 soros positivos e de 3 soros negativos nas diluições 1:25, 1:50 e 1:100 (TABELAS 1 e 2).

Os melhores resultados obtidos foram: peptídeos na concentração de 0,125 µg por poço, soro diluído 1:25 e conjugado 1:10.000 (TABELA 2). A partir desse experimento foi possível observar que os peptídeos eram capazes de reagir com o soro de pacientes com LTA e não reagem com o soro de indivíduos saudáveis.

Para avaliação dos peptídeos, os mesmos foram usados individualmente para sensibilizar poços da microplaca e testados contra 3 soros com absorbância acima de 0,4 em teste anterior utilizando-se o AS como antígeno. O peptídeo 1 apresentou os melhores resultados e foi selecionado juntamente com o MIX para sensibilizar placas para teste de 34 indivíduos saudáveis (FIGURA 2).

O *Cut-off* obtido foi de 0,499 para o teste com o peptídeo 1 e quando a placa foi sensibilizada com o MIX dos três peptídeos o *Cut-off* foi de 0,553 (FIGURA 2).

**TABELA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MICROPLACA UTILIZADA PARA A ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE PEPTÍDEO POR POÇO DA PLACA, DA DILUIÇÃO DO CONJUGADO E DOS SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS TESTADOS**

Soro 1:25	Soro 1:50	Soro 1:100	Soro 1:25	Soro 1:50	Soro 1:100	Soro 1:25	Soro 1:50	Soro 1:100	
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	+
0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	+
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	+
1	1	1	1	1	1	1	1	1	+
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	-
0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	-
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
<b>Conjugado 1:5000</b>			<b>Conjugado 1:7500</b>			<b>Conjugado 1:10.000</b>			

Nota: Os números da tabela representam a concentração de antígeno. Coloração cinza representa os locais de adição dos soros positivos, a coloração branca representa os locais de adição dos soros negativos.

**TABELA 2 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS APÓS LEITURA DA PLACA COM REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA APRESENTADA NA TABELA 1**

Soro 1:25	Soro 1:50	Soro 1:100	Soro 1:25	Soro 1:50	Soro 1:100	Soro 1:25	Soro 1:50	Soro 1:100	
0,25	0,14	0,09	0,33	0,17	0,10	0,24	0,16	0,10	+
0,23	0,13	0,08	0,23	0,12	0,09	0,26	0,13	0,08	+
0,22	0,13	0,08	0,27	0,13	0,09	0,26	0,14	0,09	+
0,25	0,13	0,08	0,25	0,15	0,10	0,06	0,13	0,09	+
0,10	0,05	0,04	0,09	0,05	0,04	0,06	0,05	0,09	-
0,07	0,04	0,04	0,08	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	-
0,09	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	0,06	0,04	0,04	-
0,09	0,05	0,04	0,06	0,04	0,04	0,06	0,04	0,05	-
<b>Conjugado 1:5000</b>			<b>Conjugado 1:7500</b>			<b>Conjugado 1:10.000</b>			

Nota: Coloração cinza representa os locais de adição dos soros positivos, a coloração branca representa os locais de adição dos soros negativos.

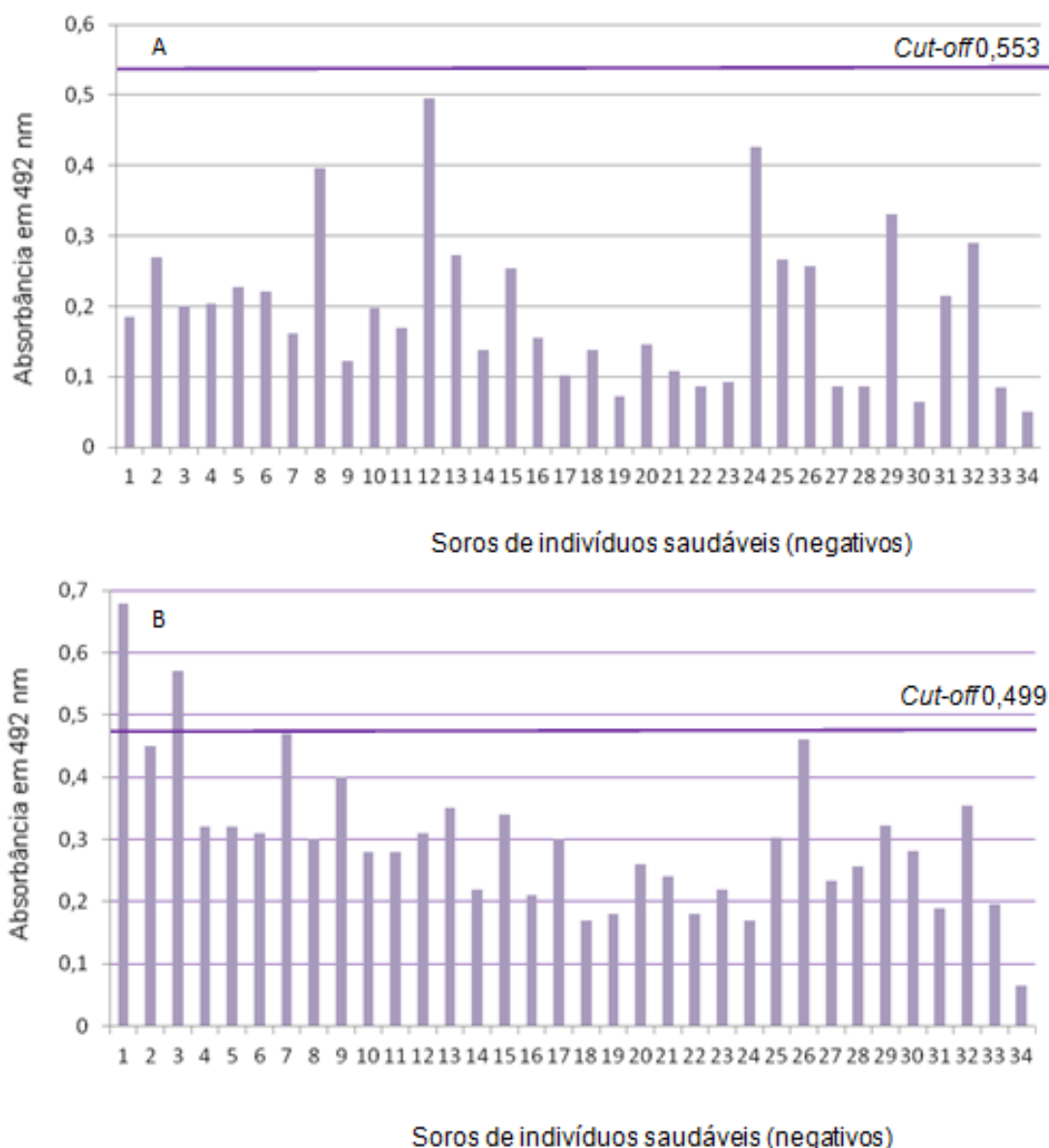
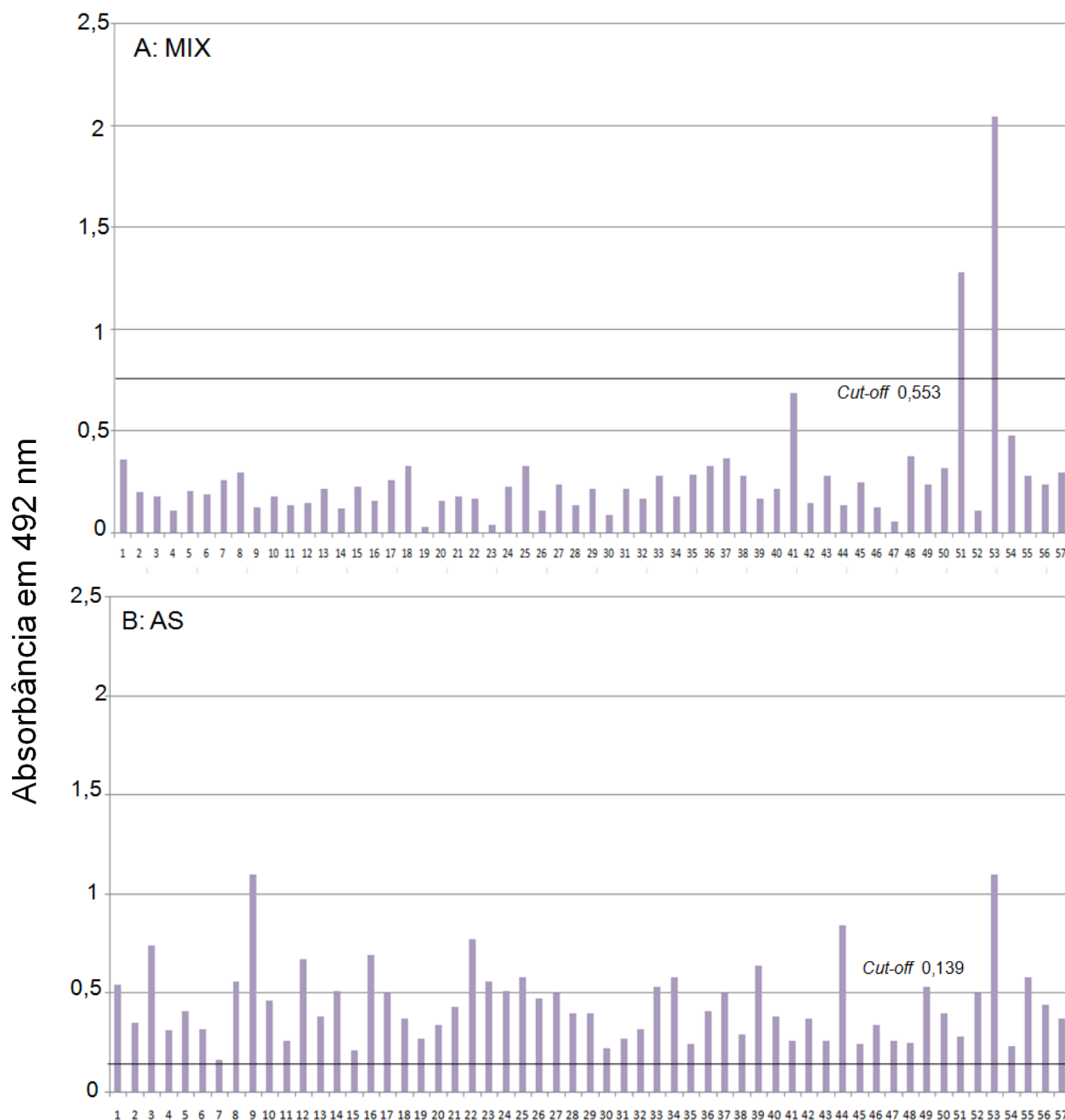


FIGURA 2 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA INDIRETO REALIZADO COM MIX DOS PEPTÍDEOS (A) OU COM O PEPTÍDEO 1 (B) E O SORO DE 34 INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS. Placas foram sensibilizadas com 0,125 µg/poço e incubadas com soro humano de indivíduos saudáveis diluído 1:25. A detecção foi realizada com conjugado anti-humano ligado a peroxidase e o OPD foi utilizado como cromógeno.

Para avaliar uma possível concordância dos resultados utilizando-se o MIX dos peptídeos e o AS, estes foram utilizados para sensibilização da placa ELISA e avaliação da soro-reatividade das 57 amostras de soro de indivíduos com suspeita de LTA (FIGURA 3).



Soro de 57 indivíduos com teste ELISA positivo

FIGURA 3 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA INDIRETO REALIZADO COM MIX DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS (A) OU ANTÍGENO SOLÚVEL (B) DE *Leishmania braziliensis* FRENTE AO SORO DE 57 INDIVÍDUOS COM SUSPEITA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. Placas foram sensibilizadas com 0,125 µg/poço dos peptídeos ou 0,5 µg/poço do AS e incubadas com soro humano diluído 1:25. A detecção foi realizada com conjugado anti-humano ligado a peroxidase e o OPD foi utilizado como cromógeno

Nesta etapa, duas diferentes soluções de bloqueio foram também testadas. Além disso, uma placa idêntica foi realizada utilizando-se como antígeno os peptídeos 1, 2, 3 isolados e conjugados à molécula KLH. Observou-se que a conjugação com KLH não melhorou os resultados até então obtidos e tampouco as soluções de bloqueio com caseína 2% e com BSA 3% (dados não mostrados). Desta forma, optou-se pela realização dos demais testes com solução de BSA 3% e peptídeos 1, 2, 3 não conjugados à molécula KLH. Foi realizado também o teste ELISA com os peptídeos com a sequência KKG adicionada em sua estrutura. Porém, o resultado não foi alterado demonstrando que essa sequência não interferiu nos resultados obtidos. Foram selecionados para a realização de testes peptídeos sem a adição da sequência KKG.

Como os resultados desta primeira análise não foram satisfatórios (visto que os peptídeos não foram capazes de identificar pacientes com anticorpos anti-*Leishmania* - FIGURA 3A), 48 peptídeos derivados dos três primeiramente obtidos foram sintetizados baseando-se na técnica ALA-scan, a fim de avaliar a importância de cada resíduo de aminoácido na sequência peptídica. O objetivo foi identificar sequências com maior reatividade frente a amostras positivas para LTA e baixa reatividade com amostras de indivíduos saudáveis. O teste ELISA foi realizado nas condições padronizadas anteriormente (0,125 µg de peptídeo, soro 1:25 e conjugado anti-IgG humana Fc específica-peroxidase), um *pool* de dois soros positivos, que apresentavam alta absorbância nos testes anteriores, e um soro negativo para uma triagem inicial dos resultados. Em uma primeira análise seis dos 48 novos peptídeos sintetizados apresentaram resultados promissores. Os melhores resultados foram observados com os peptídeos 6, 9, 12, 18, 19, 26 (FIGURA 4). Os seis peptídeos foram testados posteriormente, em diferentes condições, a fim de se chegar a resultados satisfatórios.

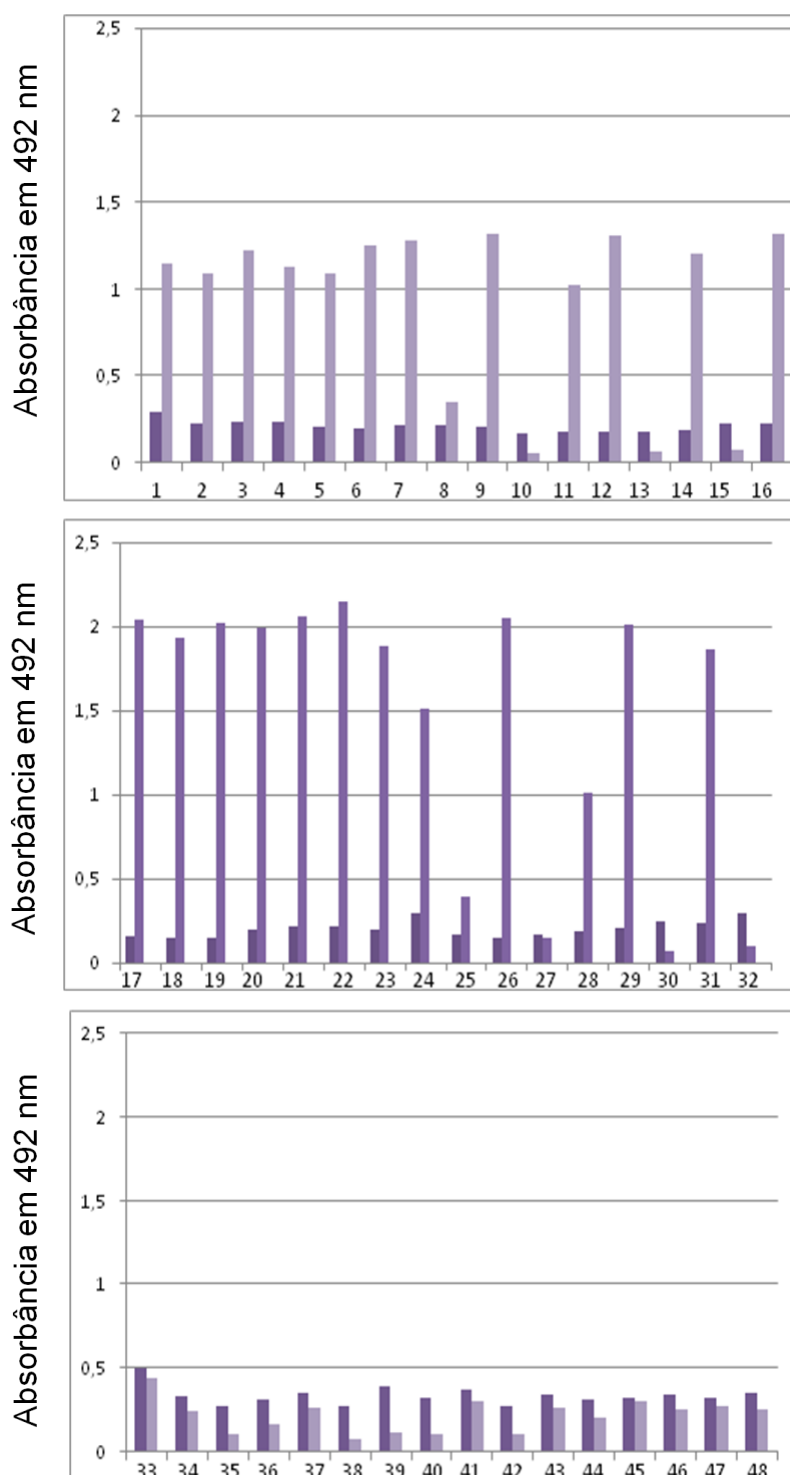


FIGURA 4 - ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA INDIRETO REALIZADO COM 48 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS FRENTE SOROS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (BARRAS CLARAS) OU COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (BARRAS ESCURAS). Os peptídeos 1, 17 e 33 referem-se aos peptídeos originais (P-1, P-2 e P-3 respectivamente). Moléculas 2 a 16 (derivados do peptídeo 1), 18 a 32 (derivados do peptídeo 2) e 34 a 48 (derivados do peptídeo 3). Placas foram sensibilizadas com os 48 peptídeos sintéticos (0,125 µg/poço) e incubadas com soro humano diluído 1:25. A detecção foi realizada com conjugado anti-humano ligado a peroxidase e o OPD foi utilizado como cromógeno.

Definidas as melhores condições, os seis peptídeos foram avaliados frente ao soro de pacientes com LTA e indivíduos saudáveis. No entanto, os resultados dos testes ELISA com esses peptídeos não demonstraram melhora em relação aos resultados utilizando os peptídeos originais e neste momento retomaram-se os estudos com os três peptídeos primeiramente identificados.

Em uma tentativa de amplificar a reação e diminuir o *background* foi utilizado um novo conjugado anti-IgG humana Fc específica, agora ligado à biotina, que posteriormente reage com a neutravidina-peroxidase. Novo teste foi realizado em diferentes condições (concentração de peptídeo 0,5 µg a 3 µg, soro diluído 1:25 e 1:50, anti-IgG humana Fc específica-biotina 0,25 µg/mL a 2,5 µg/mL, neutravidina-peroxidase 12,5 ng/mL a 200 ng/mL e avaliando a relação entre *pool* de soros positivos e *pool* de soros negativos (valor obtido dividindo a absorbância do soro positivo pela absorbância do soro negativo procurando pelo valor mais alto). Ficaram estabelecidas as melhores condições de teste com 1 µg de peptídeo/poço, soro diluído 1:50, 0,25 µg/mL de conjugado anti-Ig G humana biotinilado específico para porção Fc e 12,5 ng/mL de neutravidina-peroxidase.

A partir destas definições foram testados todos os soros positivos, negativos e de indivíduos com outras doenças contra o MIX de peptídeos e contra os peptídeos 1, 2 e 3 isolados para que se pudesse calcular a sensibilidade, especificidade e reação cruzada do teste ELISA indireto para diagnóstico da LTA.

Uma análise prévia das absorbâncias dos soros de indivíduos de área indene frente aos antígenos em estudo foi realizada. Nos testes utilizando o AS o soro de um indivíduo se comportou como extremo e por isso foi retirado do estudo (FIGURA 5).



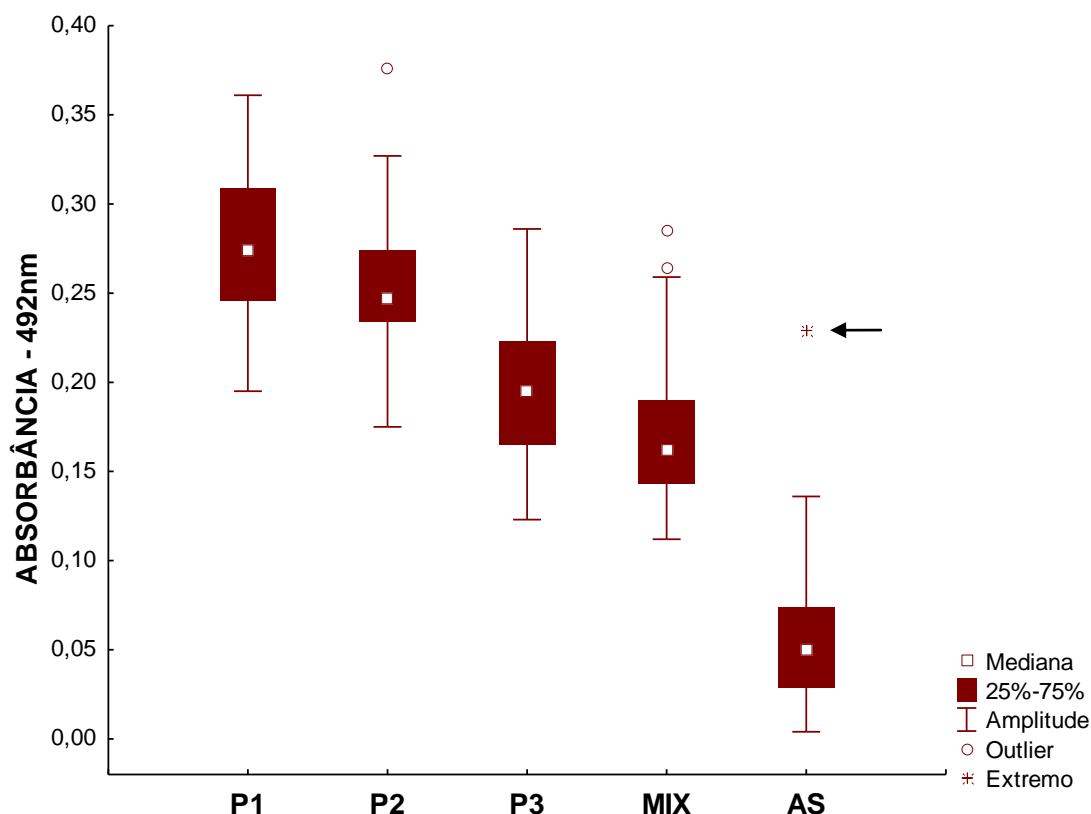


FIGURA 5 – RESULTADO INICIAL DOS SOROS DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO FRENTE AOS ANTÍGENOS DO ESTUDO. Teste ELISA indireto foi realizado sensibilizando-se as placas com os antígenos P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel) e utilizando-se o soro de indivíduos saudáveis.

### 3.5 COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL

No Grupo 1, quando compara-se P-1, P-2, P-3 e MIX com AS, encontra-se diferença significativa entre MIX e AS ( $p=0,045$ ) (FIGURA 6). No Grupo 2, é encontrada diferença significativa entre P-3 e AS ( $p<0,001$ ) e entre MIX e AS ( $p<0,001$ ) (FIGURA 7).

Em ambos os grupos, não foi encontrada diferença entre P-1 e AS e entre P-2 e AS. Os peptídeos P-1 e P-2 não são significativamente diferentes do AS, sugerindo poder apresentar resultados similares no diagnóstico da LTA. Já o P-3 e o MIX subestimam o valor da absorbância, quando comparado ao AS. Sendo assim, sob esta ótica, não parecem ser uma boa alternativa no diagnóstico da LTA (TABELA 3).

TABELA 3 - MÉDIAS DAS ABSORBÂNCIAS, DESVIO PADRÃO, VALOR DE P DOS SOROS DOS PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2 FRENTE AOS ANTÍGENOS DO ESTUDO EM TESTE ELISA

Grupos	Antígenos	n	Média	Desvio padrão	Valor de p (Peptídeos x AS)
G1	P-1	25	0,378	0,155	0,698
	P-2	25	0,340	0,140	0,754
	P-3	25	0,259	0,108	0,087
	MIX	25	0,242	0,113	0,045
	AS	25	0,357	0,287	-
G2	P-1	57	0,412	0,136	0,794
	P-2	57	0,362	0,132	0,198
	P-3	57	0,275	0,093	<0,001
	MIX	57	0,272	0,104	<0,001
	AS	57	0,404	0,229	-

G1: PACIENTES DO GRUPO 1 (TESTE PARASITOLÓGICO POSITIVO), G2: PACIENTES DO GRUPO 2 (TESTE SOROLÓGICO POSITIVO).

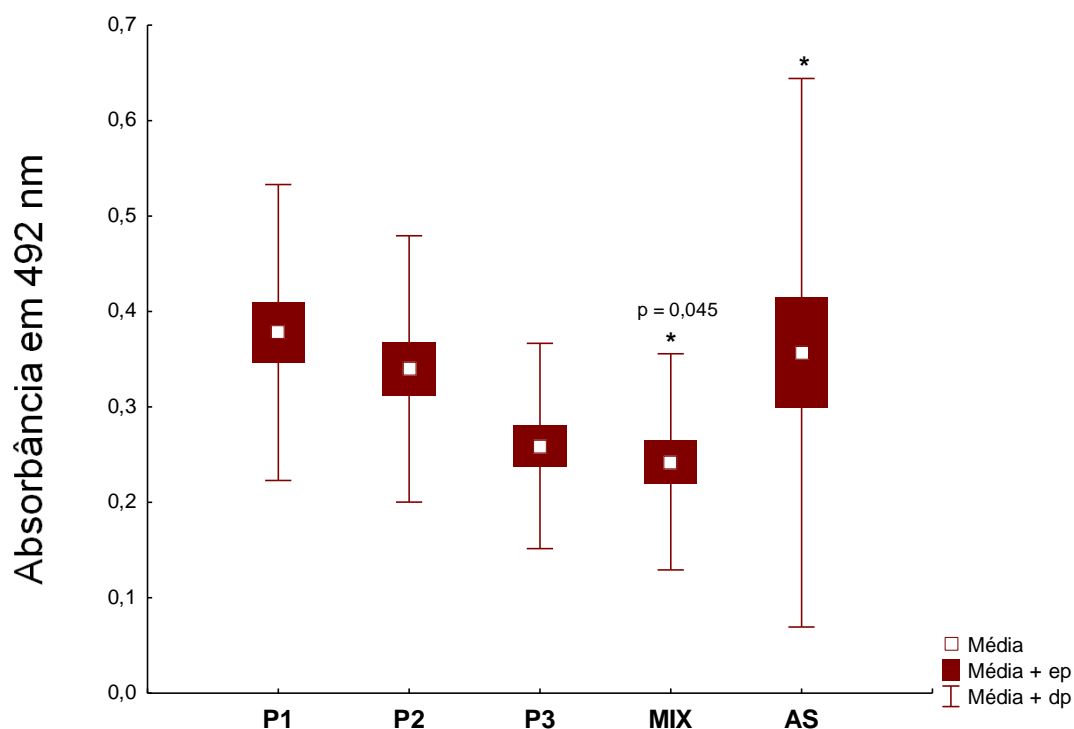


FIGURA 6 – ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA UTILIZANDO SORO DE PACIENTES DO GRUPO 1 (TESTE PARASITOLÓGICO POSITIVO) FRENTE AOS ANTÍGENOS P1 (PEPTÍDEO 1), P2 (PEPTÍDEO 2), P3 (PEPTÍDEO 3), MIX (P1+P2+P3) OU AS (ANTÍGENO SOLÚVEL). Ep:erro padrão, dp:desvio padrão

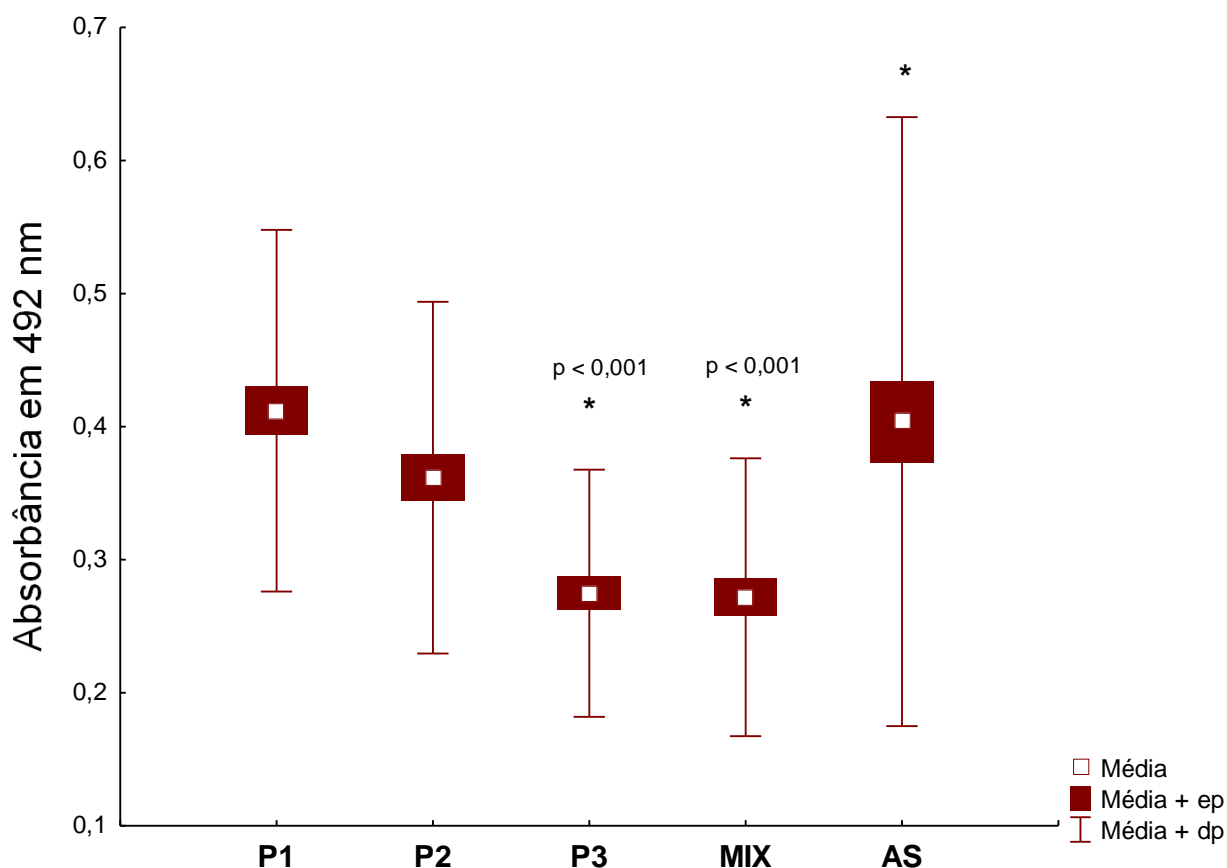


FIGURA 7 – ABSORBÂNCIAS OBTIDAS EM TESTE ELISA UTILIZANDO SORO DE PACIENTES DO GRUPO 2 (TESTE SOROLÓGICO POSITIVO) FRENTE AOS ANTÍGENOS P1 (PEPTÍDEO 1), P2 (PEPTÍDEO 2), P3 (PEPTÍDEO 3), MIX (P1+P2+P3) OU AS (ANTÍGENO SOLÚVEL). Ep:erro padrão, dp:desvio padrão

### 3.6 REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL FRENTE A SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS E DOENTES EM TESTE ELISA

As reatividades obtidas com o P-1, P-2, P-3, MIX e AS frente ao soro de indivíduos sadios e de pacientes dos Grupos 1 e 2 são apresentadas nas FIGURAS 8 (ponto de corte definido pela média das absorvâncias do grupo controle negativo mais dois desvios padrão - 2SD) e 9 (ponto de corte fornecido pela curva ROC).

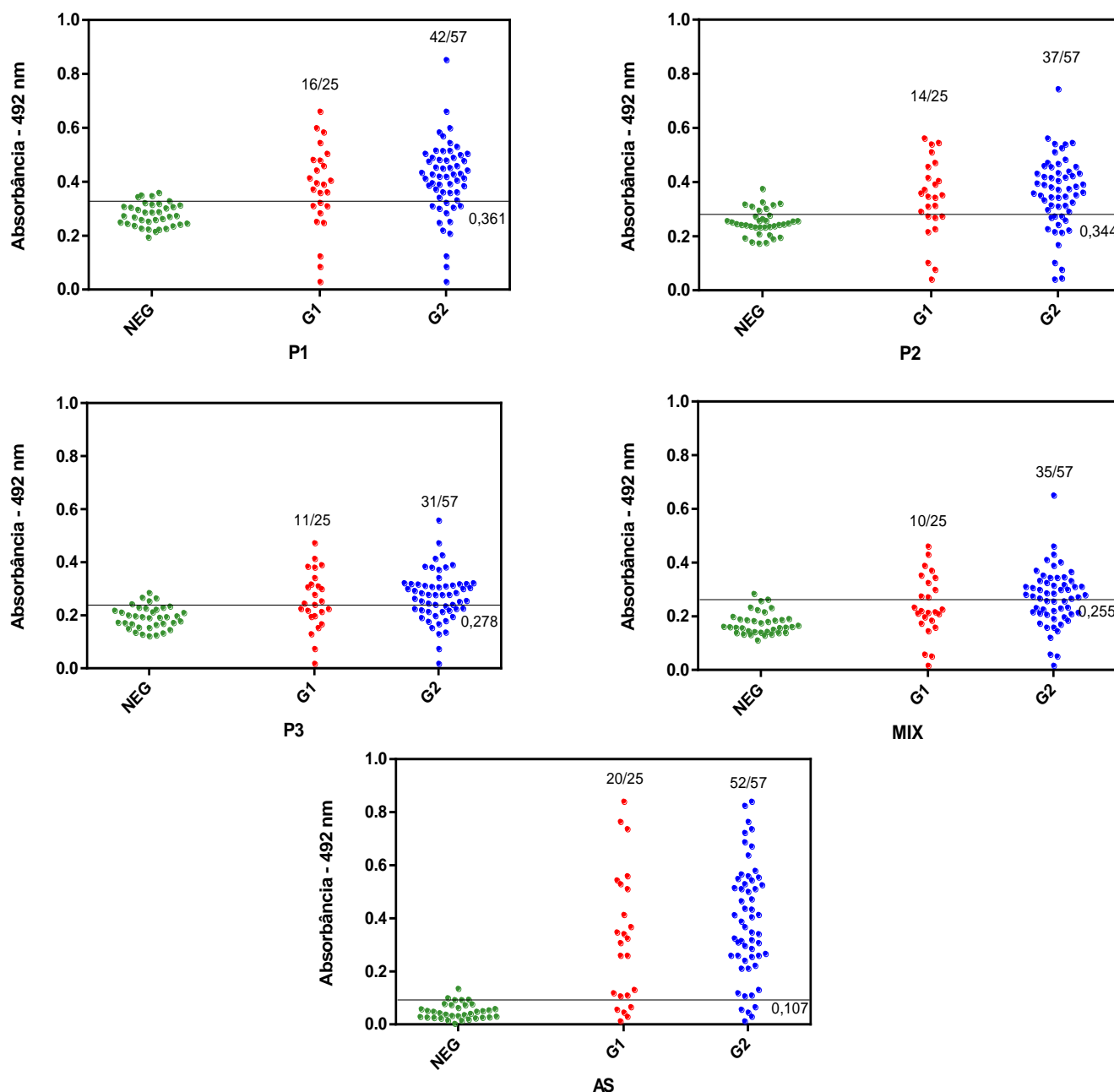


FIGURA 8 – REATIVIDADE DO PEPTÍDEO 1, PEPTÍDEO 2, PEPTÍDEO 3, MIX E AS CONTRA O SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (NEG) OU COM LTA (G1=GRUPO 1 E G2=GRUPO 2) – 2SD (CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO). Placas foram sensibilizadas com 1 µg/mL do peptídeo 1, 2, 3 ou MIX (concentração iguais dos três peptídeos totalizando 1 µg) e incubadas com soro humano diluído 1:50. A detecção foi realizada com anti-IgG humana (porção Fc específica) ligada a biotina e com neutravidina conjugada a peroxidase. Para o teste com AS as placas foram sensibilizadas com 0,5 µg/mL de AS e incubadas com soro diluído humano diluído 1:100. A detecção foi realizada com conjugado anti-humano ligado a peroxidase e o OPD foi utilizado como cromógeno. A linha horizontal representa o *Cut-off* (média das absorbâncias em 492 nm mais duas vezes o desvio padrão). As formas geométricas representam o resultado de um indivíduo.

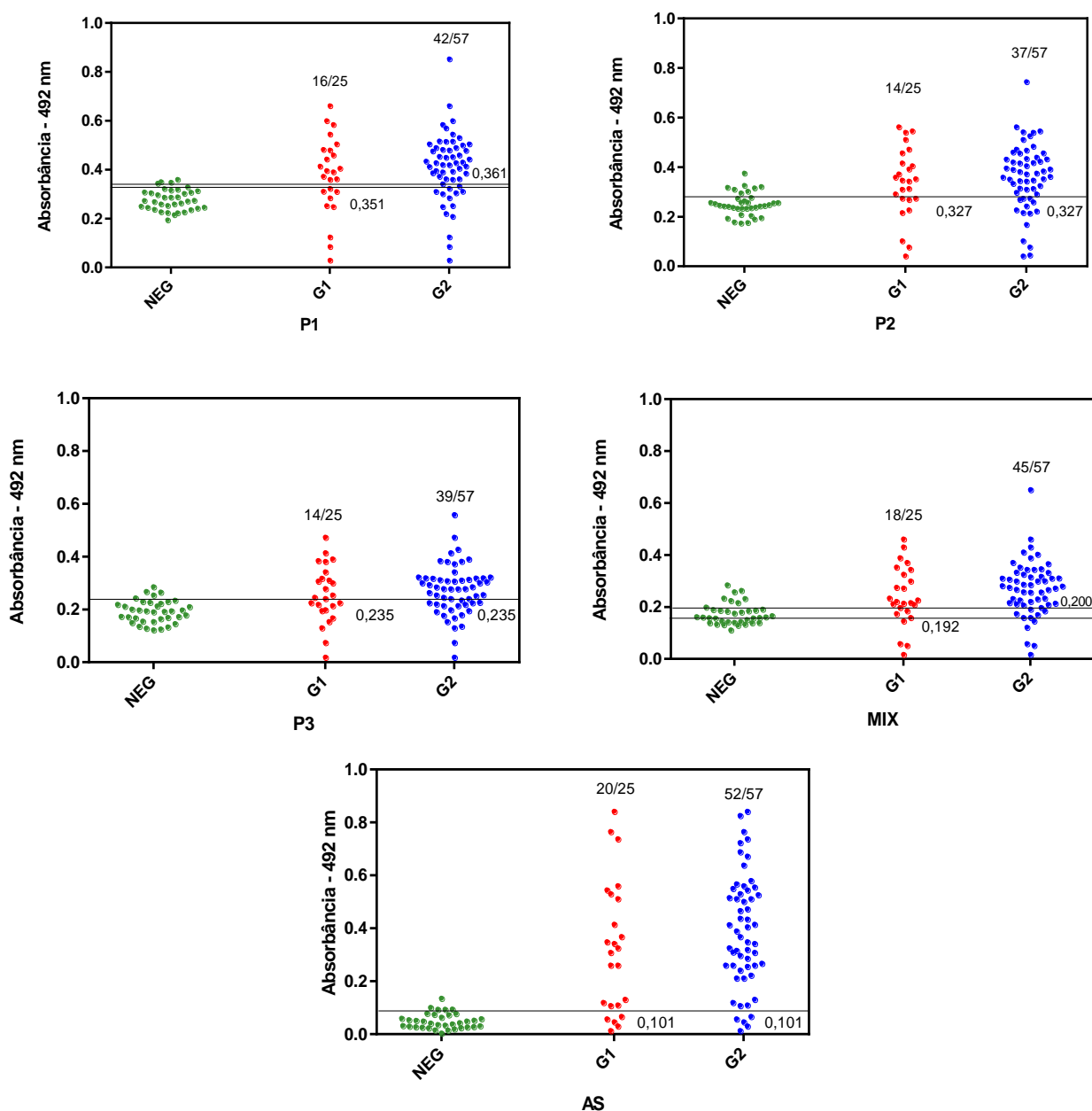


FIGURA 9 – REATIVIDADE DO PEPTÍDEO 1, PEPTÍDEO 2, PEPTÍDEO 3, MIX E AS CONTRA O SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (NEG) OU COM LTA (G1=GRUPO 1 E G2=GRUPO 2) - CURVA ROC (*RECEIVER OPERATING CHARACTERISTICS*). Placas foram sensibilizadas com 1 µg/mL do peptídeo 1, 2, 3 ou MIX (concentração iguais dos três peptídeos totalizando 1 µg) e incubadas com soro humano diluído 1:50. A detecção foi realizada com anti-IgG humana (porção Fc específica) ligada a biotina e com neutravidina conjugada a peroxidase. Para o teste com AS as placas foram sensibilizadas com 0,5 µg/mL de AS e incubadas com soro diluído humano diluído 1:100. A detecção foi realizada com conjugado anti-humano ligado a peroxidase e o OPD foi utilizado como cromógeno. A linha horizontal representa o *Cut-off* (fornecido pela curva ROC). As formas geométricas representam o resultado de um indivíduo.

Nos testes realizados com os peptídeos e soro de pacientes dos Grupos 1 e 2 (2SD) observou-se que o melhor desempenho foi encontrado com o P-1 (FIGURA 8).

Uma alteração nas reatividades foi verificada com auxílio da curva ROC, pois, neste caso, observou-se que entre os peptídeos, o MIX detectou o maior número de pacientes dos Grupos 1 e 2 (FIGURA 9).

Quanto ao AS, as reatividades obtidas sofreram pequenas variações com aplicação dos diferentes cálculos.

As análises realizadas que consideram a linha de corte do teste o cálculo 2SD demonstraram que entre os 25 pacientes do Grupo 1 sete (28%) foram positivos em todos os testes (P-1, P-2, P-3, MIX e AS) e 16 (64%) foram positivos em dois ou mais testes. Dois pacientes (8%) foram considerados negativos em todos os testes, incluindo o AS de *L. braziliensis*. Neste Grupo (1) observa-se também que cinco soros (20%) de pacientes com LTA foram negativos no teste utilizando-se o AS, enquanto que oito (32%) foram negativos para o teste utilizando-se os peptídeos ou o MIX para sensibilizar as microplacas. Interessantemente três soros de pacientes do Grupo 1, não reagentes no teste utilizando-se o AS apresentaram positividade no teste com os peptídeos (TABELA 4, APÊNDICE 2).

Considerando a linha de corte obtida com a curva ROC verifica-se que no Grupo 1 o antígeno que apresentou maior capacidade de diagnosticar pacientes foi o AS seguido do MIX de peptídeos, sendo que este apresentou aumento de 40 para 72% na capacidade de diagnosticar pacientes com aplicação deste cálculo (TABELA 4).

Na análise global dos 57 soros de indivíduos suspeitos de LTA 81% (Grupo 2 - 2SD) e 84% (Grupo 2 - ROC) foram positivos nos testes utilizando-se os peptídeos ou MIX como antígenos sensibilizadores no teste ELISA proposto (APÊNDICES 3 e 6), demonstrando a habilidade destas moléculas para atuação no diagnóstico da leishmaniose.

Apenas dois pacientes foram negativos em todos os testes avaliados (P-1, P-2, P-3, MIX e AS), representando 3,7% do total de pacientes que não seriam diagnosticados ao utilizar-se todos os antígenos aqui testados (APÊNDICES 3 e 6).

TABELA 4 - ABSORBÂNCIAS E RESULTADOS OBTIDOS APÓS REALIZAÇÃO DE TESTE ELISA COM SORO DE PACIENTES DO GRUPO 1 (TESTE PARASITOLÓGICO POSITIVO) CONTRA O PEPTÍDEO 1, PEPTÍDEO 2, PEPTÍDEO 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL

INDIVÍ- DUOS	2SD					ROC				
	P-1	P-2	P-3	MIX	AS	P-1	P-2	P-3	MIX	AS
	C.o.= 0,361	C.o.= 0,344	C.o.= 0,278	C.o.= 0,255	C.o.= 0,107	C.o.= 0,351	C.o.= 0,327	C.o.= 0,235	C.o.= 0,192	C.o.= 0,101
1	0,60	0,54	0,42	0,37	0,55	0,60	0,54	0,42	0,37	0,55
2	0,36	0,31	0,28	0,23	0,35	0,36	0,31	0,28	0,23	0,35
3	0,48	0,42	0,31	0,33	0,74	0,48	0,42	0,31	0,33	0,74
4	0,39	0,35	0,25	0,22	0,31	0,39	0,35	0,25	0,22	0,31
5	0,55	0,55	0,39	0,39	0,42	0,55	0,55	0,39	0,39	0,42
6	0,41	0,37	0,26	0,21	0,33	0,41	0,37	0,26	0,21	0,33
7	0,29	0,27	0,22	0,15	0,12	0,29	0,27	0,22	0,15	0,12
8	0,44	0,41	0,32	0,35	0,56	0,44	0,41	0,32	0,35	0,56
9	0,25	0,22	0,15	0,19	0,11	0,25	0,22	0,15	0,19	0,11
10	0,42	0,35	0,24	0,30	1,10	0,42	0,35	0,24	0,30	1,10
11	0,32	0,29	0,20	0,18	0,26	0,32	0,29	0,20	0,18	0,26
12	0,37	0,34	0,23	0,27	0,26	0,37	0,34	0,22	0,27	0,26
13	0,31	0,28	0,20	0,22	0,51	0,31	0,28	0,20	0,22	0,51
14	0,59	0,51	0,39	0,43	0,13	0,59	0,51	0,39	0,43	0,13
15	0,40	0,36	0,23	0,22	0,03	0,40	0,36	0,22	0,22	0,03
16	0,31	0,28	0,38	0,23	0,37	0,31	0,28	0,38	0,23	0,37
17	0,25	0,23	0,17	0,16	0,11	0,25	0,23	0,17	0,16	0,11
18	0,13	0,10	0,08	0,06	0,34	0,13	0,10	0,08	0,06	0,34
19	0,48	0,46	0,31	0,35	0,77	0,48	0,46	0,31	0,35	0,77
20	0,03	0,04	0,02	0,02	0,01	0,03	0,04	0,02	0,02	0,01
21	0,09	0,08	0,13	0,05	0,06	0,09	0,08	0,13	0,05	0,06
22	0,51	0,47	0,34	0,21	0,84	0,51	0,47	0,34	0,21	0,84
23	0,66	0,56	0,47	0,46	0,05	0,66	0,56	0,47	0,46	0,05
24	0,46	0,39	0,30	0,28	0,53	0,46	0,39	0,30	0,28	0,53
25	0,36	0,31	0,22	0,20	0,07	0,36	0,31	0,22	0,20	0,07
Total +	16	14	11	10	20	16	14	14	18	20
%	64	56	44	40	80	64	56	56	72	80

Nota: Coloração cinza e azul representam resultados positivos no teste com aquele antígeno, C.o.: Cut-off, 2SD: dois desvios padrão, ROC: Receiver Operating Characteristic. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).

### 3.7 REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL EM TESTE ELISA CONTRA SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS, HANSENÍASE OU TUBERCULOSE

As reatividades dos soros de pacientes com doença de chagas, hanseníase e tuberculose nos teste ELISA contra peptídeos sintéticos e AS são apresentadas nas FIGURAS 10, 11 e APÊNDICES 4 e 7.

A utilização do AS como antígeno e soro de pacientes com doença de chagas apresentou o maior número de reações cruzadas (6/10). Utilizando-se o MIX a reatividade com soros de pacientes com doenças de Chagas foi resolvida (0% em 2SD e ROC) e com o P-1 esta reatividade se restringiu a 1 em 10 soros. Entre os peptídeos a maior reatividade cruzada foi observada com o MIX e soro de pacientes com tuberculose (4/10).

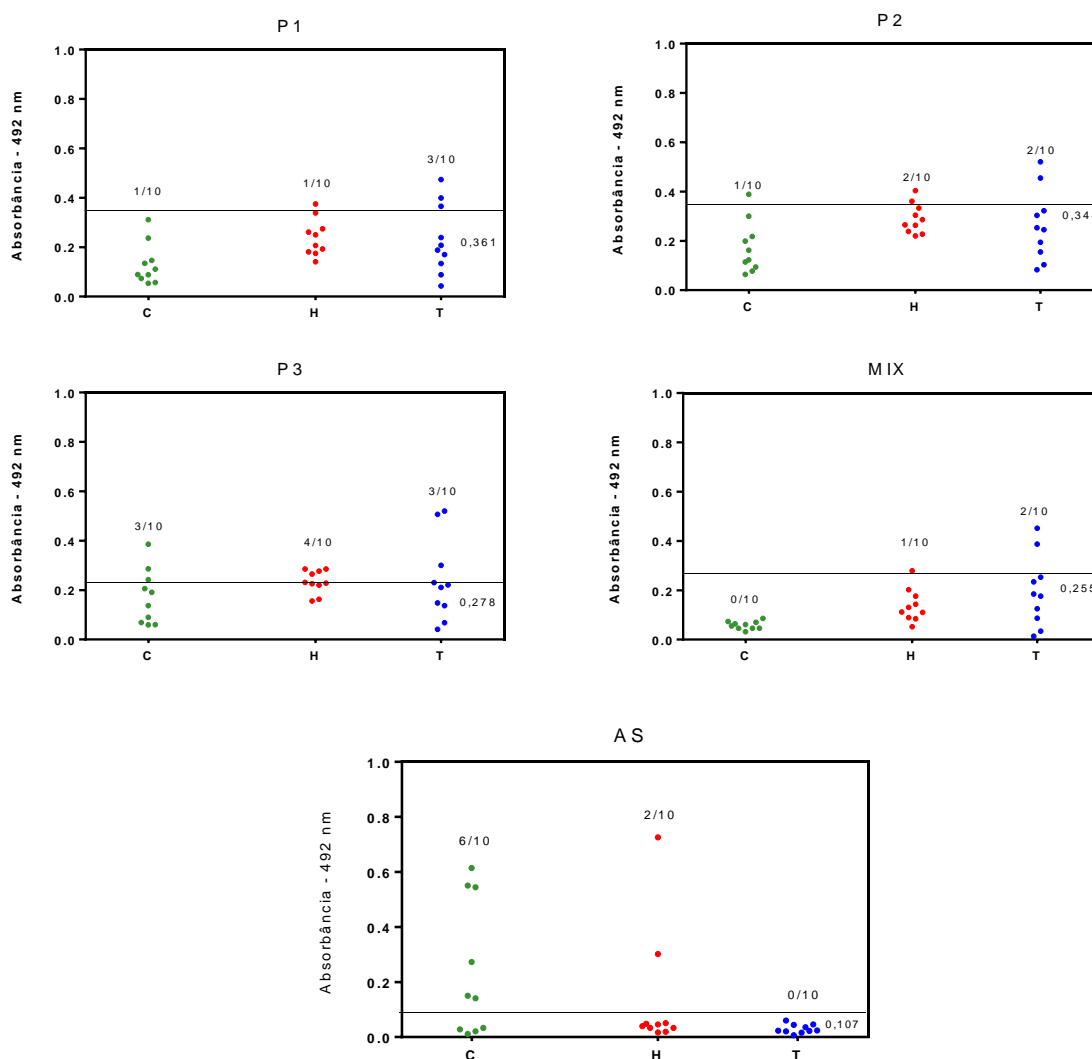


FIGURA 10 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL CONTRA O SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS HANSENÍASE E TUBERCULOSE (PONTO DE CORTE DEFINIDO PELA MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS DO GRUPO CONTROLE NEGATIVO MAIS DOIS DESVIOS PADRÃO). C: soro de pacientes com doença de chagas, H: soro de pacientes com hanseníase, T: soro de pacientes com tuberculose. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).



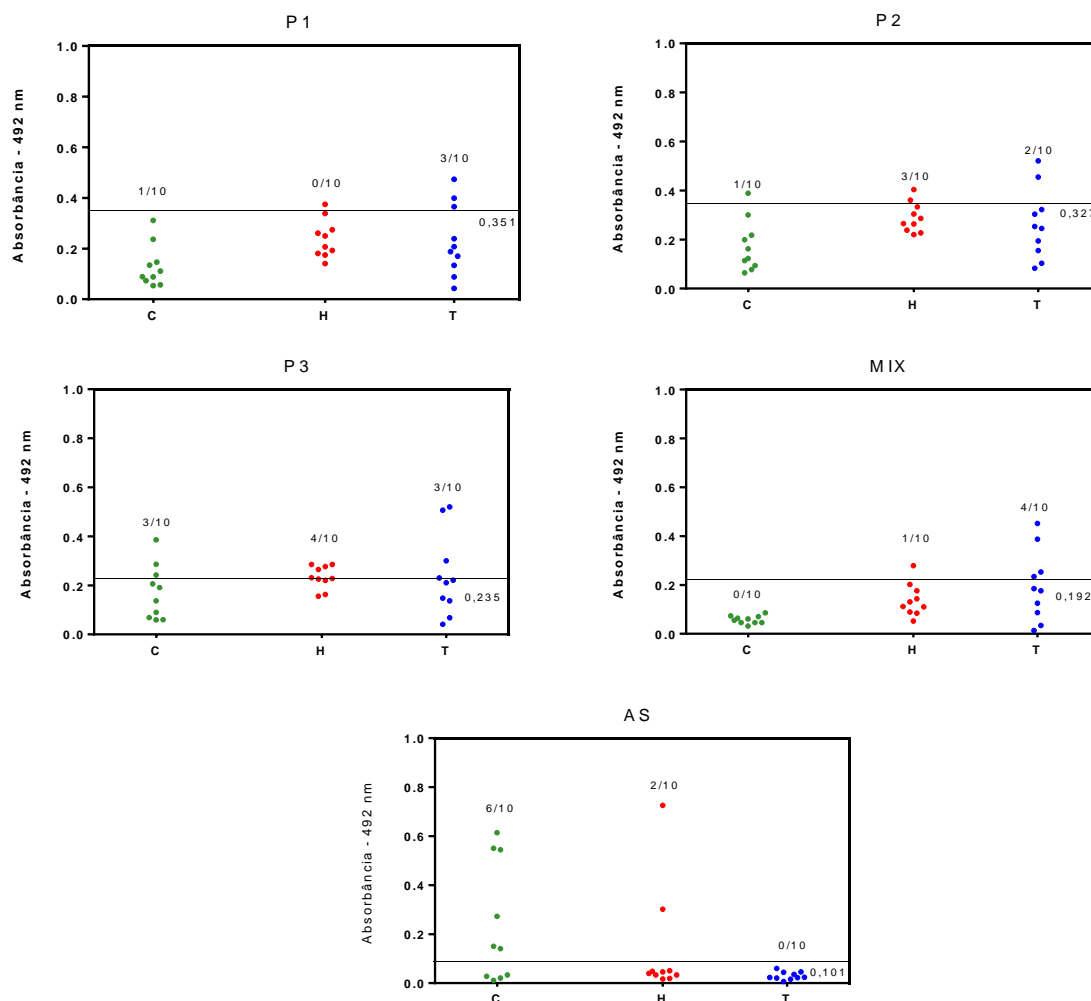


FIGURA 11 - REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL CONTRA O SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS HANSENÍASE E TUBERCULOSE (PONTO DE CORTE FORNECIDO PELA CURVA ROC). C: soro de pacientes com doença de chagas, H: soro de pacientes com hanseníase, T: soro de pacientes com tuberculose. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).

### 3.8 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL NO TESTE ELISA UTILIZANDO O CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÕES

As sensibilidades e especificidades do teste ELISA utilizando-se os peptídeos ou o AS como antígenos e considerando o cálculo de dois desvios padrão são dados nas TABELAS 5 e 7.

Em relação ao Grupo 1, a realização do teste ELISA com o P-1 ou AS como antígenos apresentou os maiores valores de sensibilidade (64 e 80% respectivamente). No Grupo 2 as sensibilidades obtidas foram superiores (74 e 91% para o P-1 e AS respectivamente). Já as especificidades do teste variaram de 92 a 97%, representando uma boa capacidade do ensaio em identificar os verdadeiramente negativos.

TABELA 5 – VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA COM OS PEPTÍDEOS 1, 2, 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL

	<b>Sensibilidade %</b>	<b>Especificidade %</b>
<b>P-1 - G1</b>	64	97
<b>P-1 - G2</b>	74	97
<b>P-2 - G1</b>	56	97
<b>P-2 - G2</b>	65	97
<b>P-3 - G1</b>	44	97
<b>P-3- G2</b>	54	97
<b>MIX - G1</b>	40	92
<b>MIX- G2</b>	61	92
<b>AS - G1</b>	80	97
<b>AS - G2</b>	91	97

P-1: Peptídeo 1, P-2: Peptídeo 2, P-3: Peptídeo 3, MIX: P-1+P-2+P3, G1: Grupo 1, G2: Grupo 2, 2SD: dois desvios padrão, ROC: *Receiver Operating Characteristic*.

### 3.9 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL NO TESTE ELISA UTILIZANDO CÁLCULO ROC

O nível de corte da reação (*Cut-off*) estabelecido pela Curva ROC variou conforme o antígeno utilizado (FIGURA 12, TABELA 6).

As sensibilidades do teste ELISA aqui proposto em pacientes do Grupo 1 e 2, variaram entre 56 a 79%, quando usado como antígeno os peptídeos (só ou em

combinação). Para o antígeno solúvel as sensibilidades foram de 80 a 91% (TABELA 5).

Analisando os valores obtidos para os Grupos 1 e 2, verificou-se que a especificidade do teste variou de 78 a 100% quando se utilizou os peptídeos individualmente ou em MIX como antígenos. Para o AS a especificidade foi de 97% nos dois grupos (TABELA 6).

No Grupo 1, a realização do teste com o MIX e AS como antígenos apresentou os maiores valores de sensibilidade (72 e 80% respectivamente). No Grupo 2 as sensibilidades obtidas foram superiores (79 e 91% para o MIX e AS respectivamente).

Todas as áreas sob a curva (AUC) foram significativamente maiores que 0,5 indicando que os antígenos avaliados discriminam bem os resultados positivos e negativos (FIGURA 12).

**TABELA 6 – VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA COM OS PEPTÍDEOS 1, 2, 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL**

	<b>C.O. &gt;</b>	<b>SENS %</b>	<b>I.C.</b>	<b>ESP %</b>	<b>I.C.</b>
<b>P-1/G1</b>	0,351	64	42,5-82,0	97	85,8-99,9
<b>P-1/G2</b>	0,361	72	58,5-83,0	100	90,5-100,0
<b>P-2/G1</b>	0,327	56	34,9-75,6	97	85,8 -99,9
<b>P-2/G2</b>	0,327	65	51,1-77,1	97	85,8-99,9
<b>P-3/G1</b>	0,235	56	34,9-75,6	86	71,2-95,5
<b>P-3/G2</b>	0,235	68	54,8-80,1	86	71,2-95,5
<b>MIX/G1</b>	0,192	72	50,6-87,9	78	61,8-90,2
<b>MIX/G2</b>	0,200	79	66,1-88,6	81	64,8-92,0
<b>AS/G1</b>	0,101	80	59,3-93,2	97	85,1-99,9
<b>AS/G2</b>	0,101	91	80,7-97,1	97	85,1-99,9

P-1: Peptídeo 1, P-2: Peptídeo 2, P-3: Peptídeo 3, MIX: P-1+P-2+P3, G1: Grupo 1, G2: Grupo 2, SENS: Sensibilidade, ESP: Especificidade, I.C: Intervalo de confiança, C.o: *Cut-off*, 2SD: dois desvios padrão, ROC: *Receiver Operating Characteristic*

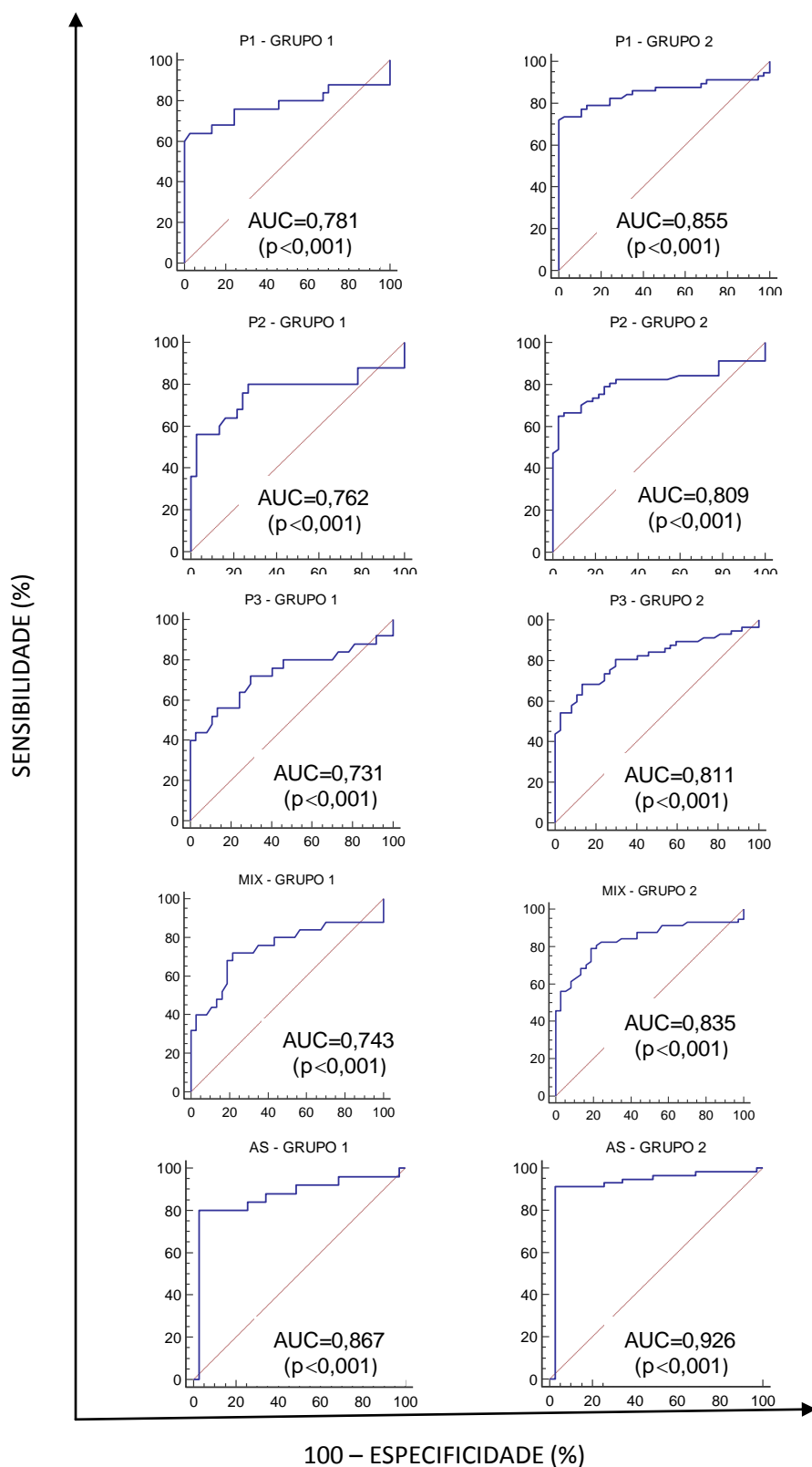


FIGURA 12 - CURVAS ROC PARA O ANTÍGENO SOLÚVEL (AS) E PEPTÍDEOS INDIVIDUALMENTE OU EM COMBINAÇÃO (MIX) NOS GRUPOS 1 E 2. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).

### 3.10 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE OBTIDOS

Ao analisar os valores de sensibilidade e especificidade obtidos verifica-se que os antígenos em estudo apresentam bons indicadores para o diagnóstico da LTA (TABELA 7).

Observa-se comportamento semelhante entre os dois grupos no que diz respeito aos valores obtidos nos dois cálculos para obtenção da linha de corte (FIGURAS 13 e 14). No entanto, o cálculo baseado em análises da curva ROC aumentou consideravelmente a sensibilidade do MIX e do P-3. Para o P-1 e P-2 não foram observadas grandes melhoras ao utilizar-se esta ferramenta (TABELA 7).

Entre os dez valores de sensibilidades obtidos observa-se que 8 foram maiores utilizando-se o cálculo ROC. Entre os peptídeos a maior sensibilidade encontrada, foi utilizando-se o MIX e o cálculo ROC. Por outro lado a menor sensibilidade encontrada (40% para o MIX) foi verificada no cálculo utilizando 2SD.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO GERAL DAS SENSIBILIDADES E ESPECIFICIDADES OBTIDAS

	SENS %	ESP %	SENS %	ESP %
	2SD		ROC	
<b>P1-G1</b>	64	97	64	97
<b>P1-G2</b>	74	97	72	100
<b>P2-G1</b>	56	97	56	97
<b>P2-G2</b>	65	97	65	97
<b>P3-G1</b>	44	97	56	86
<b>P3-G2</b>	54	97	68	86
<b>MIX-G1</b>	40	92	72	78
<b>MIX-G2</b>	61	92	79	81
<b>AS-G1</b>	80	97	80	97
<b>AS-G2</b>	91	97	91	97

G1: Grupo 1, G2: Grupo 2, SENS: Sensibilidade, ESP: Especificidade, 2SD = dois desvios padrão, ROC= *Receiver Operating Characteristic*. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).

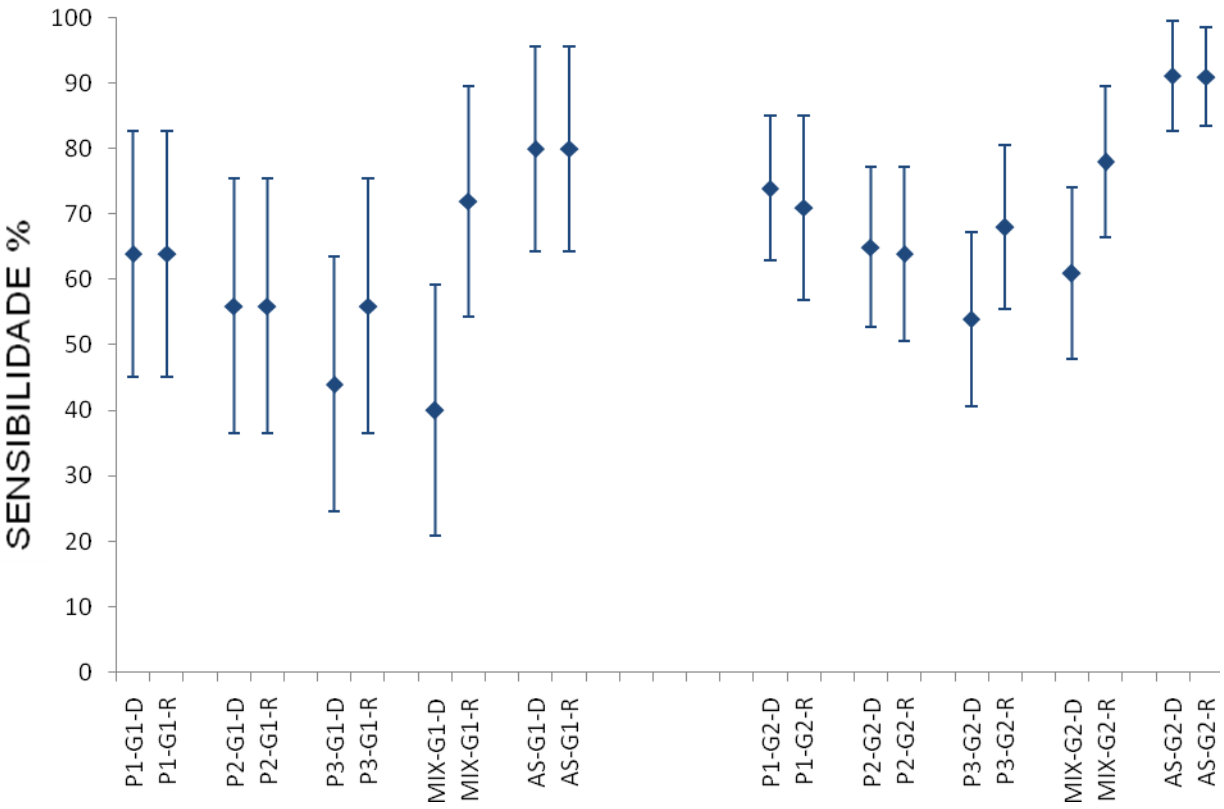


FIGURA 13 – SENSIBILIDADES, INTERVALOS DE CONFIANÇA, ANTÍGENOS, GRUPOS E SEUS RESPECTIVOS CÁLCULOS PARA OBTENÇÃO DA LINHA DE CORTE. D: CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO, R: CURVA ROC, G1: PACIENTES DO GRUPO 1, G2: PACIENTES DO GRUPO 2

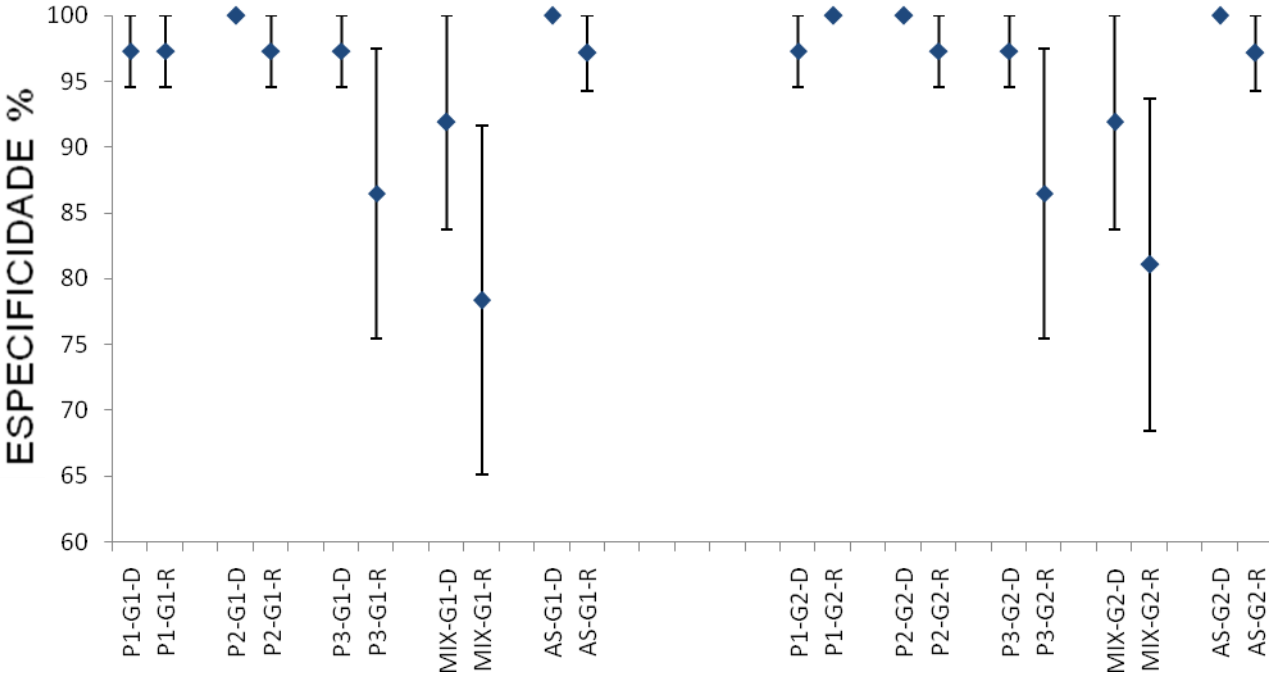


FIGURA 14 – ESPECIFICIDADES, INTERVALOS DE CONFIANÇA, ANTÍGENOS, GRUPOS E SEUS RESPECTIVOS CÁLCULOS PARA OBTENÇÃO DA LINHA DE CORTE. D: CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO, R: CURVA ROC, G1: PACIENTES DO GRUPO 1, G2: PACIENTES DO GRUPO 2. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).

### 3.11 CONCORDÂNCIA DOS PEPTÍDEOS COM O ANTÍGENO SOLÚVEL EM TESTE ELISA

Os testes ELISA realizados com P-1, P-2, P-3 e MIX *versus* o AS são dados nas TABELAS 8 e 9.

TABELA 8 – CONCORDÂNCIA DOS TESTES ELISA REALIZADOS COM O P-1, P-2, P-3 OU MIX *VERSUS* ANTÍGENO SOLÚVEL EM SOROS DO GRUPO 1 E 2 CONSIDERANDO A UTILIZAÇÃO DO CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DA LINHA DE CORTE INICIAL

Antígeno	GRUPO 1			GRUPO 2		
	Concordância (%)	Discordância (%)	Kappa	Concordância (%)	Discordância (%)	Kappa
P-1	64	36	0,16	74	26	0,16
P-2	64	36	0,23	67	33	0,16
P-3	60	40	0,25	58	42	0,15
MIX	56	44	0,20	68	32	0,23
GERAL	68	32	0,21	81	19	0,25

TABELA 9 – CONCORDÂNCIA DOS TESTES ELISA REALIZADOS COM O P-1, P-2, P-3 OU MIX *VERSUS* ANTÍGENO SOLÚVEL EM SOROS DO GRUPO 1 E 2 CONSIDERANDO A UTILIZAÇÃO DO CÁLCULO DA CURVA ROC PARA DETERMINAÇÃO DA LINHA DE CORTE INICIAL

Antígeno	GRUPO 1			GRUPO 2		
	Concordância (%)	Discordância (%)	Kappa	Concordância (%)	Discordância (%)	Kappa
P-1	64,0	36,0	0,16	71,9	28,1	0,08
P-2	64,0	36,0	0,23	66,7	33,3	0,12
P-3	72,0	28,0	0,40	73,7	26,3	0,24
MIX	76,0	24,0	0,41	80,7	19,3	0,26
GERAL	72,0	28,0	0,27	84,2	15,8	0,31

### 3.12 VALOR PREDITIVO POSITIVO E NEGATIVO DO TESTE ELISA COM PEPTÍDEOS E ANTÍGENO SOLÚVEL

Para análise dos valores preditivos positivos e negativos dois cenários foram constituídos. O primeiro levou em consideração a taxa de prevalência de LTA obtida da população em inicial deste estudo (198 suspeitos de LTA - 28,8%). O cenário dois considerou em seu cálculo a prevalência de 6,1% (valor este obtido em análises de indivíduos da região Norte do Paraná - CRUZ, 2008).

No cenário um, que considera a prevalência superior (28,8%) o valor preditivo positivo foi alto (por exemplo 90,5% para P1-G1-R). Desta forma, dado que um teste se apresente positivo a probabilidade do mesmo ser verdadeiro é alta. No cenário dois o valor foi inferior (por exemplo 60,6% para P1-G1-R).

Quanto ao valor preditivo negativo, considerando o cenário 1, quando o teste for negativo a chance de não ter a doença é menor que para o cenário 2 (TABELA 10).

TABELA 10 – VALOR PREDITIVO POSITIVO E NEGATIVO DO TESTE ELISA COM OS PEPTÍDEOS 1, 2, 3, MIX E ANTÍGENO SOLÚVEL

	VP+ (28,8%)	VP+ (6,1%)	VP- (28,8%)	VP- (6,1%)
P1-G1-D	90,5	60,6	87,0	97,7
P1-G1-R	90,5	60,6	87,0	97,7
P2-G1-D	100,0	100,0	84,9	97,2
P2-G1-R	89,3	57,4	84,5	97,1
P3-G1-D	86,8	51,4	81,1	96,4
P3-G1-R	62,6	21,2	82,9	96,8
MIX-G1-D	66,6	24,3	79,1	95,9
MIX-G1-R	57,4	17,8	87,4	97,7
AS-G1-D	91,9	64,5	92,3	98,7
AS-G1-R	91,9	64,5	92,3	98,7
P1-G2-D	91,7	64,0	90,2	98,3
P1-G2-R	100,0	100,0	89,5	98,2
P2-G2-D	100,0	100,0	87,6	97,8
P2-G2-R	90,5	60,6	87,0	97,7
P3-G2-D	89,0	56,5	83,9	97,0
P3-G2-R	67,1	24,6	87,0	97,7
MIX-G2-D	75,3	32,8	85,3	97,3
MIX-G2-R	62,5	21,1	90,1	98,3
AS-G2-D	100,0	100,0	96,6	99,4
AS-G2-R	100,0	100,0	96,5	99,4

VP+: VALOR PREDITIVO POSITIVO, VP-: VALOR PREDITIVO NEGATIVO, CENÁRIO 1: 28,8%, CENÁRIO 2: 6,1%, D: CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO, R: CURVA ROC, G1: PACIENTES DO GRUPO 1, G2: PACIENTES DO GRUPO 2.



### 3.13 PRECISÃO DOS TESTES ELISA COM OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E COM O ANTÍGENO SOLÚVEL

A análise de precisão demonstrou comportamento semelhante entre os Grupos 1 e 2. As maiores probabilidades de acerto dos testes foram apresentadas pelo P-1, P-2, MIX e AS (TABELA 11).

TABELA 11 – PRECISÃO DOS TESTES ELISA AVALIADOS

<b>ANTÍGENOS, GRUPOS E CÁLCULOS CONSIDERADOS</b>	<b>PRECISÃO %</b>
P1-G1-D	83,9
P1-G1-R	83,9
P2-G1-D	82,3
P2-G1-R	80,6
P3-G1-D	75,8
P3-G1-R	74,2
MIX-G1-D	71
MIX-G1-R	75,8
AS-G1-D	90
AS-G1-R	90
P1-G2-D	83
P1-G2-R	84
P2-G2-D	78,7
P2-G2-R	77,7
P3-G2-D	71,3
P3-G2-R	75,5
MIX-G2-D	73,4
MIX-G2-R	79,8
AS-G2-D	94,6
AS-G2-R	93,5

D: CÁLCULO DE DOIS DESVIOS PADRÃO, R: CURVA ROC, G1: PACIENTES DO GRUPO 1, G2: PACIENTES DO GRUPO 2. P1 (peptídeo 1), P2 (peptídeo 2), P3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3) ou AS (antígeno solúvel).

## 4 DISCUSSÃO

Um dos desafios para a superação das limitações das técnicas de imunodiagnóstico das leishmanioses encontra-se na produção de antígenos. Como fonte de produção dos mesmos, tem sido usado o parasito completo, extratos solúveis, peptídeos sintéticos ou antígenos recombinantes.

Pela gama de antígenos avaliados sensibilidades variáveis são observadas na literatura para o teste ELISA, tornando difícil a comparação de estudos. Isto fica claro quando na análise do Kit EIE-LVC Bio-Manguinhos feita por Lira (2005) verificou-se sensibilidade de 72% e especificidade de 87,5%, dados estes que diferem significativamente dos de Faria *et al.*, 2011 que encontraram 13 e 100% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Por isso, é fundamental dispor de testes com antígenos padronizados, com reprodutibilidade e possibilidade de produção em larga escala para um diagnóstico correto e rápido (LIRA *et al.*, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007, SZARGIKI *et al.*, 2009; FARIA *et al.*, 2011).

Na presente pesquisa o antígeno solúvel obtido de formas promastigotas de *L. braziliensis* (AS) apresentou sensibilidades de 80 a 91% em análise do Grupo 1 e 2 respectivamente (2SD e ROC), valor semelhante ao obtido por Szargiki e colaboradores (2009) que obtiveram em teste ELISA com AS de *L. braziliensis* sensibilidade de 95%. Diferenças de valores podem estar relacionadas com o painel de soros avaliados, com os procedimentos realizados durante a produção dos antígenos, como por exemplo, no tempo de incubação dos reagentes, soluções de bloqueio e tipo de microplacas utilizadas (REITHINGER *et al.*, 2007).

Variações da população estudada também podem trazer diferenças no perfil de sensibilidade e especificidade dos testes. Em pacientes com lesões recentes (um a seis meses de evolução) é frequente a negatividade sorológica e maior sensibilidade dos testes parasitológicos (MONTENEGRO, 1926). Destacam-se aqui dois soros pacientes do Grupo 1 (com ambos os cálculos empregados) que tiveram sorologia negativa nos cinco testes sorológicos avaliados apesar do parasito ter sido demonstrado em lesões cutâneas.

Nos casos de sorologia positiva, os títulos médios são significativamente mais elevados nos pacientes que apresentam lesões múltiplas, refletindo a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitos. Após o tratamento e cura,

os títulos tendem a cair ou desaparecer em alguns meses (MONTENEGRO, 1926; CHIARI, 1973). Estes fatos representam o desafio a ser vencido para realização do diagnóstico das leishmanioses na atualidade.

Outra preocupação em relação à utilização do AS em testes ELISA refere-se ao comportamento de cepas de *Leishmania* em diferentes meios de cultura. Estudos mostram que pode ocorrer expressão de diferentes epítomos antigênicos quando os parasitos são cultivados em meios com formulações diferentes (SCHUSTER e SULLIVAN, 2002; SOMANNA *et al.*, 2002; MUNIARAJ *et al.*, 2007; RODRIGUES, 2010).

Analisando as reações cruzadas obtidas no presente trabalho percebe-se que *Trypanosoma cruzi* é o agente que apresentou maior reatividade no teste que com antígeno solúvel de *L. braziliensis* no ELISA. Este fato pode ser justificado pela próxima relação filogenética entre *Leishmania* e *T. cruzi* (BADARÓ *et al.*, 1986). Esta reatividade cruzada foi resolvida quando foi utilizado o MIX ou o P-1. Neste caso, os peptídeos sintéticos, reduziram a possibilidade de tratamentos desnecessários em pessoas que não sofrem com LTA, ou seja que apresentariam exames falsos positivos.

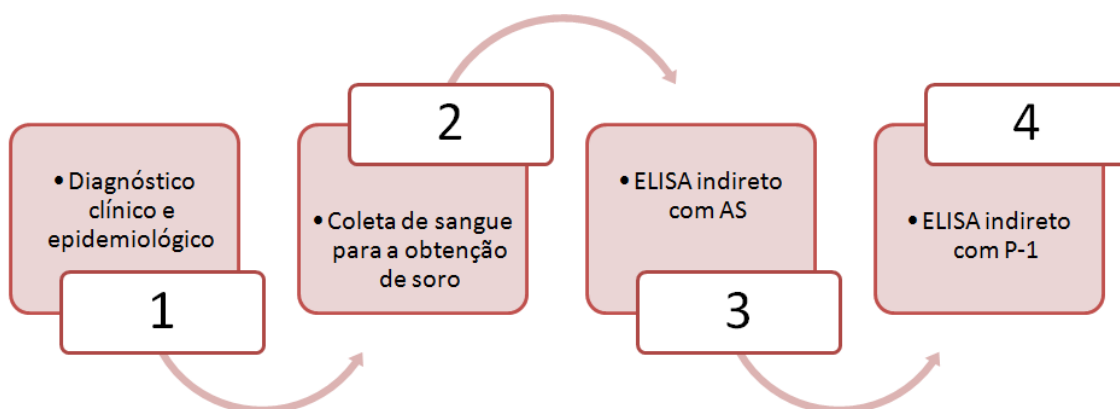
O teste ELISA indireto possui vantagens na aplicação em imunodiagnóstico da leishmaniose, pois apresenta versatilidade, por seus resultados não serem dependentes do observador e pode ser adaptado à automatização, permitindo seu emprego em larga escala (MURREL *et al.*, 1986). A obtenção de antígenos purificados para diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias é promissor já que proporcionam reprodutibilidade dos testes. Essas moléculas são estáveis e não dependerem de cultivo em meios específicos para sua produção.

O cálculo com auxílio da curva ROC apresentou a maior sensibilidade entre os peptídeos (79%) e o cálculo utilizando 2SD forneceu a menor sensibilidade (40%), demonstrando que a aplicação da metodologia ROC é importante para detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes.

De modo geral, o P-1 e o MIX apresentaram os melhores desempenhos (74 e 79% de sensibilidade respectivamente) entre os peptídeos. Este valor é considerando de extrema importância considerando-se a necessidade de produção de novos de testes ELISA para diagnóstico da LTA e a escassez de estudos direcionados para esta forma da doença.

A maioria dos estudos relacionados à detecção da leishmaniose visam o diagnóstico da forma canina da doença e nestes observa-se que a sensibilidades e especificidades encontradas utilizando-se peptídeos recombinantes em teste ELISA foram respectivamente 75 e 90% (FUMAGALLI *et al.*, 2013), 88 e 95% (FARIA *et al.*, 2011), 76 a 100% e 90 a 97% (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e 100% e 98% (PORROZI *et al.*, 2007). Já para LV humana as sensibilidades e especificidades de 100% e 100% (PASSOS *et al.*, 2005), 81% e 100% (COSTA *et al.*, 2012), 76 a 100% e 90 a 97% (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Uma proposta que surge desse estudo para o diagnóstico imunológico da leishmaniose é a realização de um primeiro teste de ELISA utilizando o AS seguido de um segundo teste utilizando os peptídeos sintéticos. Um algoritmo baseado na realização de teste ELISA com antígeno solúvel e posteriormente com o P-1 é sugerido na FIGURA 15.



**FIGURA 15 – ALGORITMO PROPOSTO PARA DIAGNOSTICO LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.** Em indivíduos com suspeita de LTA primeiramente é realizado o diagnóstico clínico e epidemiológico, seguido da coleta de sangue e obtenção de soro para realização de um primeiro teste ELISA indireto como AS como antígenos seguido de um novo teste utilizando o P-1.

Desta forma, as placas sensibilizadas com um maior número de epítomos, como os presentes em antígenos solúveis, proporcionariam bons resultados, especialmente em testes de triagem, dando oportunidade de identificação de diferentes indivíduos que respondem de maneira individual a um mesmo agente. Já a realização do teste com o P-1 otimizaria, por exemplo, a questão dos soros de pacientes, não reagentes no teste utilizando-se o AS que apresentaram positividade no teste com os peptídeos.

O P-1 apresentou a melhor relação sensibilidade/especificidade, precisão e resolução da reatividade cruzada com soro de pacientes com doença de chagas. Além disso os resultados da aplicação do teste t sugeriram que o P-1 seria melhor que o MIX no diagnóstico da LTA.

Propõe-se a investigação futura de testes ELISA com diferentes combinações dos três peptídeos identificados. Testá-los como antígenos em outras metodologias sorológicas torna-se interessante, como por exemplo, em testes ELISA multiplex que tem como vantagem a análise simultânea de múltiplos peptídeos.

Visando a realização de diagnósticos em domicílio, no campo ou em regiões com poucos recursos, análises de dispositivos imunocromatográficos poderiam ser realizadas. Desta forma os antígenos seriam impregnados em membranas. Os anticorpos anti-*Leishmania*, se presentes nas amostras, se ligariam ao conjugado formando um complexo e este, por sua vez, fluiria pela membrana indo ligar-se aos antígenos imobilizados na área da reação positiva, determinando o surgimento de uma banda colorida. As vantagens dos testes imunocromatográficos incluem o fácil manuseio, o resultado que é fornecido em pouco tempo, o fato de poder ser usado em clínicas, laboratórios, no campo ou em casa e o resultado ser de fácil interpretação.

Os resultados verificados nesta pesquisa demonstram a importância destas novas moléculas para o diagnóstico da leishmaniose e visam dar um passo à frente neste contexto.

## 5 CONCLUSÕES

As melhores condições para teste ELISA utilizando-se os peptídeos sintéticos identificados foram testadas e padronizadas.

Os três peptídeos e o MIX foram imunorreativos contra soros de pacientes com LTA no teste ELISA.

O P-1 apresentou a melhor relação sensibilidade/especificidade, precisão e resolução da reatividade cruzada com soro de pacientes com doença de chagas. Além disso os resultados da aplicação do teste t sugeriram que o P-1 seria melhor que o MIX no diagnóstico da LTA.

## 6 PERSPECTIVAS

A obtenção de maior quantidade de soro de pacientes que apresentem diferentes formas clínicas de leishmaniose poderia ser útil para desvendar a possibilidade de utilização dos peptídeos como antígenos para diagnóstico das de outras formas clínicas da doença.

Ainda, seria interessante a obtenção de soros de pacientes com LTA caracterizados clinicamente visando investigar, por exemplo, se os peptídeos apresentam desempenho diferenciado no diagnóstico sorológico de diferentes fases desta parasitose no homem.

A obtenção de soros de animais com leishmaniose e padronização de testes ELISA com estas amostras abriria a possibilidade de utilização dos peptídeos como antígenos para diagnóstico da leishmaniose animal.

## REFERÊNCIAS

ALBAN, S. M. **Uso de peptídeos para o diagnóstico imunológico da hanseníase.** Tese (Curso de Pós-Graduação em Processos biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BADARÓ, R. *et al.* Evaluation of the micro enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis. Antigen selection for detection of infection specific responses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 72-78, jan. 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2010.

CASTRO, E. A. **Aspectos epidemiológicos e Parasitológicos da leishmaniose tegumentar americana em duas Regiões do Estado do Paraná e o Papel do cão na Manutenção do Ciclo de *Leishmania*.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2001.

CHIARI, A. C.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P. A. Reação de imunofluorescência no controle do tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, p. 298-303, 1973.

COSTA, M. M. *et al.* Improved Canine and Human visceral Leishmaniasis Immunodiagnosis Using Combinations of Synthetic Peptides in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1622, may 2012.

CRUZ, M. F. R. **Estudo epidemiológico de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Itambaracá, região norte do Estado do Paraná, Brasil, em áreas de influência do complexo hidrelétrico na bacia do rio Paranapanema, 2004-2006.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, sept. 2004.

FARGEAS, C. *et al.* Synthetic Peptide-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 241-248, feb. 1996.



FARIA, A. L. *et al.* High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p.1309, sept. 2011.

FUMAGALLI, M. A. C. **Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *Phage display* e *spot synthesis***. 85 f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

FUMAGALLI, M. A. C. *et al.* Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 835-841, jun. 2013.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Controle da leishmaniose tegumentar americana**, Brasília, 2000.

GALEN, R. S., GAMBINO, S. R. **Beyond Normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1975.

GONTIJO, B. A reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana . 91f. Tese apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina para obtenção do grau de Doutor. Belo Horizonte, 1997.

GONTIJO, C. M. F. e MELO, M. N. leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7 n. 3, p. 338 – 349, sep. 2004.

GRADONI, L. *et al.* The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. **In: Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Intervet International bv, Sevilha, Spain, p. 7-14, 2002.

GUERRA, M. O. P. *et al.* Infecção sub-clínica na leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**.v. 60, p. 365-369, 1985.

JEKEL, J. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

KUMAR, S. *et al.* Identification and Characterization of a Novel *Leishmania donovani* Antigen for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 601-605, apr. 2012.

LACHAUD, L. *et al.* Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 1, p. 236-240, jan. 2000.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**; v. 33, p. 159-174, 1977.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MARZOCHI, M. C. *et al.* Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American Cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro). Comparative study results observed in 1974 and 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, p. 149-155, 1980.

MENDONÇA, S. C. *et al.* Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p. 347-355, 1988.

MELO, M. N. *et al.* Padronização do antígeno de Montenegro. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 19, n. 3, p. 161-164, 1977.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Seminars in Nuclear Medicine**. v. 8, n. 4, p. 283-298, oct 1978.

MONTENEGRO, J. A cutis-reação na leishmaniose. **In: Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 1, p. 323-330, 1926.

MUNIARAJ, M. Paradoxical drug sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes: an in vitro study by Agar elution and 96 well plate methods. **Journal of Community Health**. v. 39 n. 4, p. 255-256, dec. 2007.

MURREL, K. D.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. Parasitic Organisms. **Advances in Meat Research**, v. 2, p. 311-376, 1986.

NUZUM, E., *et al.* Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 3, p. 751-754, mar. 1995.

OLIVEIRA, S. G. G. *et al.* Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, dec. 2011.

PASSOS, S. *et al.* Recombinant *Leishmania* Antigens for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 10, p. 1164-1167, oct. 2005.

PORROZZI, R. *et al.* Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* visceral Infections in Dogs. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, may 2007.

REITHINGER, R. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7: 581–596, sep. 2007.

RYAN, J. R. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p.1037-1043, 2002.

RODRIGUES, E, H. G. **Validação de abordagens moleculares para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco**. 88 f. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2000.

RODRIGUES, A. *et al.* A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. **Parasitology Research**, v.106, n. 5, p. 1249-1252, 2010.

SALES-GOMES, L. A intradermorreação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas afins. **Brasil Medico**, v. 49, p. 5-15, 1939.

SCHUSTER, F. L. e SULLIVAN, J.J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p. 374–389, jul. 2002.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. *In vitro* cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms. **Acta Tropica**, v. 83, p. 37- 42, jul. 2002.

SOUZA, A. P. *et al.* Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human tegumentary Leishmaniasis Using Leishmania Recombinant Proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 6110, jun. 2013.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, feb. 2009.

YODEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**. v. 3, n. 1, 1950.

ZWEIG, M. H, CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.39, n. 4, p. 561-577.

## CAPÍTULO 3

### Avaliação de peptídeos sintéticos na imunoprofilaxia da leishmaniose experimental

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar três peptídeos sintéticos selecionados pela técnica de *Phage display* e o MIX dos três peptídeos (peptídeos 1+2+3) em ensaios de imunoproteção contra leishmaniose experimental (LE) em *Mesocricetus auratus*. hamsters fêmeas foram utilizadas para formar sete grupos experimentais compostos por 10 animais cada. Os grupos 1 a 3 receberam os peptídeos 1, 2 ou 3 isoladamente e o grupo 4 o MIX. Um grupo (denominado grupo 5) recebeu somente o adjuvante. O grupo 6 (controle positivo) não recebeu imunógeno na primeira etapa. Já o grupo 7 representou o grupo controle negativo e não recebeu nenhum tipo de imunização ou desafio durante o experimento. As imunizações com os peptídeos foram realizadas com 20 µg de cada peptídeo sintético ou com 60 µg do MIX dos três peptídeos juntamente com adjuvante. Quatro doses de antígeno foram aplicadas nos dias 0, 30, 60 e 90. Dez dias após a última imunização, os animais foram desafiados com 10<sup>6</sup> promastigotas cepas de *L. braziliensis*. 50% dos animais foram eutanasiados após 75 dias do desafio e 50% após 120 dias. Nestes dois períodos o escore clínico da doença foi avaliado, foram realizadas coletas de tecidos para realização da cultura parasitológica e foram obtidas amostras de sangue para dosagem de anticorpos específicos anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2a. Após 75 dias do desafio foram observadas lesões características de leishmaniose cutânea somente em um animal do grupo 1 e um animal do grupo 6, a produção de anticorpos específicos anti-IgG1 e IgG2a foi detectada em todos os grupos (sendo significativamente baixa no grupo controle negativo) e foram isolados parasitos do baço de um animal do grupo 6 e de um animal do grupo 1. Após 120 dias do desafio foi possível observar que 100% dos animais do grupo controle positivo apresentaram lesões específicas de LE enquanto que no grupo controle negativo nenhum animal apresentou lesão. Os animais que receberam o peptídeo 2 (grupo 2) apresentaram 100% de proteção. No grupo 4 (MIX) foi observada proteção de 80% dos animais e o grupo 5 66%. Somente no grupo 2 o título de anticorpos IgG e IgG2a obtidos 120 dias após o desafio apresentou-se diminuído quando comparado ao título de anticorpos do dia 75 após o desafio. Neste grupo além de não serem observadas lesões características da leishmaniose também não foram isolados parasitos na cultura dos tecidos. Estes resultados relacionam-se com a imunoproteção induzida pela administração principalmente do peptídeo 2, já que em processos de convalescença verifica-se a diminuição dos níveis de anticorpos específicos. Os resultados referentes ao uso destes peptídeos como estratégia vacinal demonstram-se promissores e apontam novas perspectivas para aplicação destas moléculas em testes vacinais.

Palavras-chave: leishmaniose. Imunoprofilaxia. Peptídeos sintéticos. Vacinas.

## CHAPTER 3

### Evaluation of Synthetic Peptides in immunoprophylaxis of the experimental Leishmaniosis

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate three synthetic peptides selected by Phage display technique and the MIX of the three peptides (peptides 1+2+3) in immunoprotection essays against experimental Leishmaniosis (EL) in *Mesocricetus auratus*. Female hamsters were used to form seven experimental groups comprising ten animals each. Groups 1 to 3 received the peptides 1, 2 and 3 separately and group 4 received the MIX. A group (called group 5) received only the adjuvant. Group 6 (positive control) did not receive the immunogen in the first step. Group 7 represented the negative control and did not receive any kind of immunization or challenge during the experiment. Immunizations with the peptides were performed with 20 µg of each synthetic peptide or with 60 µg of a MIX of the three peptides plus the adjuvant. Four antigen doses were applied on days 0, 30, 60 and 90. Ten days after the first immunization, the animals were challenged with 106 promastigotes strains of *L. braziliensis*. 50% of the animals were euthanized 75 days after the challenge and 50% after 120 days. In these two periods, the clinical score of the disease was evaluated. Tissue samples were collected to perform the parasitological culture and blood samples were obtained for dosing specific antibodies anti-IgG total, anti-IgG1 and anti-IgG2a. After 75 days after the challenge characteristic lesions of EL were observed just in one animals of group 1 and one of group 6. The production of specific antibodies anti- IgG1 and IgG2a was detected in all groups (it was significantly low on the negative control group) and parasites were isolated from the spleen of one animal from group 6 and one animal from group 1. After 120 days after the challenge, it was possible to observe that 100% of the animals from the positive control group presented specific EL lesions whereas in the negative control group animals showed no injury. Animals that received peptide 2 (group 2) showed 100% of protection. In group 4 (MIX) was observed 80% of protection in animals and group 5 showed 66% of protection. Only in group 2 the antibody titer of the antibodies IgG and IgG2a obtained 120 days after the challenge presented low values when compared to the antibody titer after 75 days after the challenge. In this group, besides not being observed characteristic lesions of leishmaniosis, no parasites were isolated in tissue culture. These results are related to the immunoprotection induced by the administration of mainly peptide 2, as in convalescent cases there is a reduction in levels of specific antibodies. The results concerning the use of these peptides as a vaccine strategy are promising and showed new perspectives for application of these molecules in vaccine trials.

Key words: Leishmaniosis. Immunoprophylaxys. Synthetic peptides. Vaccines.

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses, tegumentar (LT) e visceral (LV) são causadas por pelo menos 30 espécies de *Leishmania* spp. as quais são transmitidas por 70 espécies de flebotomíneos e que podem infectar vários mamíferos. O desenvolvimento ou não da doença depende da relação parasito-hospedeiro e da espécie de parasito envolvida (DEDET, 2007; BATES, 2007).

No homem, a doença ocorre em quatro formas clínicas principais: cutânea, muco-cutânea, Difusa e visceral. A forma visceral é a mais grave e pode causar febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, chegando a ser fatal, se não for tratada (DESJEUX, 2004; DEDET, 2007).

No Brasil e na região neotropical, as principais espécies causadoras das formas tegumentares da doença são *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. braziliensis*), *L. (Leishmania) amazonensis* (*L. amazonensis*), e *L. (V.) guyanensis* (*L. guyanensis*). As três espécies podem produzir a forma clínica mais comum da doença, a cutânea Localizada (LC), que se caracteriza por lesão ulcerada e de contorno regular na pele e que pode curar espontaneamente após algumas semanas ou meses. A forma muco-cutânea inicia-se com úlceras de pele e que se não tratada adequadamente após cinco a 20 anos podem produzir metástases na região oronasal, causando destruição tecidual que são mutilantes. A espécie responsável por esta forma clínica é *L. braziliensis*. Já a forma cutânea Difusa caracteriza-se por lesões disseminadas e são mais difíceis de curar. Estas lesões múltiplas, dificilmente ulceram e contêm alto número de parasitos. No Brasil são causadas por *L. amazonensis*. Ao contrário da forma muco-cutânea, que induz o aumento da imunidade celular do hospedeiro, a leishmaniose cutânea Difusa é caracterizada por ausência de resposta celular e não responde ao teste de Montenegro (LAINSON, 1983; DEDET, 2007).

Por ser uma doença negligenciada e de natureza complexa, o controle da leishmaniose tem apresentado falhas tanto no Velho quanto no Novo Mundo.

O desmatamento de áreas rurais, as mudanças no meio ambiente e a urbanização não planejada aumentaram o contato do homem com o vetor e a

interação com o reservatório animal. Considerando a multiplicidade de fatores que envolvem a transmissão da leishmaniose nota-se a dificuldade para se formular estratégias eficientes para o controle desta doença (LAINSON, 1983). Neste sentido, progressos ocorrem nos estudos de novos antígenos candidatos a vacinas de contra o parasito.

Uma das principais espécies de *Leishmania* usada para estudos sobre imunidade e ensaios vacinais tem sido *L. major*. Certamente estes estudos contribuíram consideravelmente para o entendimento das respostas imune de tipo Th1/Th2. Estes estudos chegaram ao consenso de que a resposta Th1 é caracterizada por elevados índices de IFN- $\gamma$  e de baixo nível de produção de IL -4 e IL-10 o que permitiria o controle da infecção por *L. major*. Enquanto que uma resposta Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) e não conduziria a este controle da doença. O mesmo modelo demonstrou ser aplicável para as outras espécies causadoras de LT, onde a resposta imune do tipo Th1 apresenta-se protetora (LOIS *et al.*, 1998; STAGER *et al.*, 2003; MILES *et al.*, 2005; WOELBING *et al.*, 2006).

Outra maneira de se avaliar o perfil de resposta imune desencadeado após administração de uma molécula seria a determinação da cinética de produção de anticorpos, visto que os títulos de IgG1 correlacionam-se com o tipo de reposta imune Th2 enquanto que os títulos de anticorpos IgG2a indicam uma resposta imune polarizada para o perfil Th1 (SNAPPER e PAUL, 1987; COFFMAN *et al.*, 1993).

Muitas das vacinas testadas atualmente para leishmaniose utilizam parasitos mortos. Ressalta-se que os primeiros ensaios clínicos de imunização com promastigotas de *Leishmania* inativados contra leishmaniose são datadas de 1939. No Brasil, Salles-Gomes em 1939, Pessoa e Pestana (1940) imunizaram indivíduos com este tipo de preparação vacinal. Os resultados sugeriram um efeito protetor do esquema vacinal com diminuição do tamanho das lesões após inoculação da suspensão nos participantes da pesquisa (SALLES GOMES, 1939; PESSOA e PESTANA, 1940).

Estimulados com os resultados obtidos das pesquisas realizadas nos anos 40, Mayrink e colaboradores realizaram novos testes contra a leishmaniose em humanos e uma "Vacina Terapêutica para leishmaniose" foi desenvolvida e denominada de Leishvacin. A Organização Mundial da Saúde autorizou a fabricação da vacina pela extinta Bioquímica do Brasil S/A (Biobrás). Após quatro anos o



Ministério da Saúde suspendeu a autorização para a produção (MAYRINK *et al.*, 1979). Essa vacina foi testada com o uso de adjuvantes em voluntários saudáveis, sendo que esse grupo apresentou maior porcentagem de indivíduos com resposta imunológica protetora frente à vacinação do que o grupo placebo. A utilização de adjuvante otimizou a resposta imune indicando que ele poderia melhorar a resposta imunológica da vacina (FOLLADOR *et al.*, 2002).

A terceira geração de vacinas estudadas e produzidas foram as de DNA sendo que foi usado como antígenos Glicoproteína de 63 KDa (GP63) entre outros. A imunização com plasmídeo que codifica GP63 foi capaz de induzir uma resposta imune de perfil Th1 e observou-se redução significativa do tamanho da lesão depois do desafio em camundongos imunizados (XU e LIEW, 1994; XU *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1998). Estudos investigaram vacinas de DNA que codificam para uma variedade de proteínas de *Leishmania* e mostrou que muitas vacinas de DNA eram capazes de induzir resposta imune Th1 e foram capazes de conferir graus variáveis de proteção quando avaliada a redução do tamanho da lesão da pele e/ou cargas parasitárias em modelo Balb/c. As vacinas de DNA foram capazes de induzir forte resposta Th1 indutora de imunidade de longa duração, e/ou melhor proteção contra a progressão da doença. Embora a maioria dos estudos usasse rotas não naturais e doses elevadas de parasito a vacinação tanto de DNA como de proteínas foram capazes de induzir, níveis similares de imunidade (SJOLANDER *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2001; IBORRA *et al.*, 2003, DUMONTEIL *et al.*, 2007). Entretanto, há uma grande variedade nos modelos animais usados e nos desenhos experimentais o que torna difícil a comparação da eficácia de diferentes vacinas para induzir uma proteção imune.

Na busca de candidatos que ofereçam eficácia na proteção contra a leishmaniose tegumentar e considerando que contamos com peptídeos sintéticos que apresentam homologia com fatores de virulência de *Leishmania* spp. este trabalho visou avaliar peptídeos produzidos por síntese química na imunoprevenção contra *L. braziliensis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS EM MODELO EXPERIMENTAL

Os peptídeos sintéticos 1, 2 e 3 individualmente ou em MIX (1+2+3) obtidos no capítulo um desta tese foram utilizados para imunizar hamsters *golden* (*Mesocricetus auratus*), conforme protocolo proposto por GAMBOA, 2008. hamsters fêmeas de quatro semanas de idade foram adquiridos do fornecedor Anilab de Paulínea – SP. Estes animais foram mantidos com ração e água *ad libitum* durante todo o experimento.

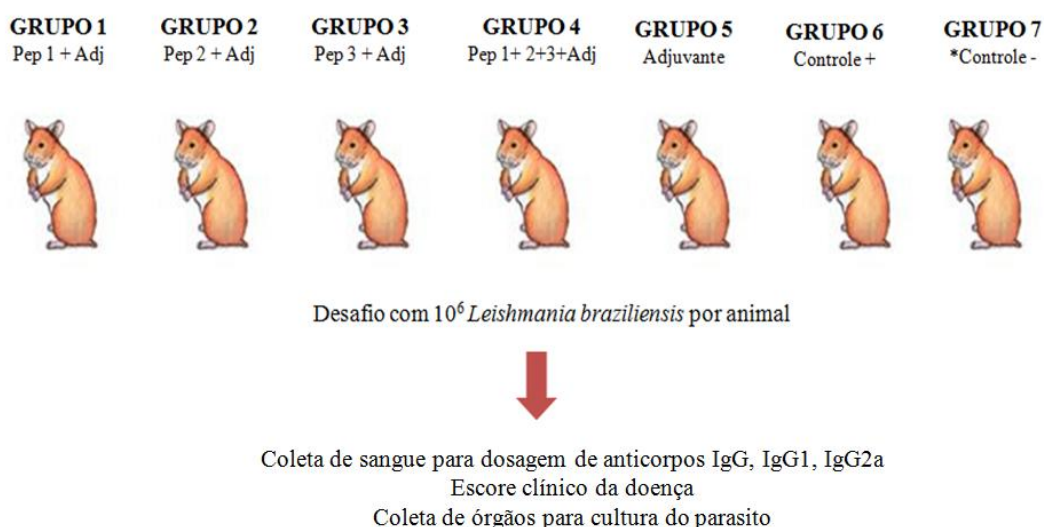
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais. Foram formados sete grupos experimentais compostos por dez animais cada. Os grupos 1 a 3 receberam os peptídeos 1, 2 ou 3 isoladamente ou em MIX (1+2+3). Um grupo (denominado grupo 5) recebeu somente o adjuvante e posteriormente o desafio com os parasitos. Um grupo considerado controle positivo não recebeu imunógeno durante o experimento e posteriormente foi submetido ao desafio com  $10^6$  de promastigotas de cepas de *L. braziliensis*. Outro, denominado controle negativo não recebeu nenhum tipo de imunização durante o experimento (FIGURA 1).

Para realização das imunizações, 20 µg de cada peptídeo sintético ou o MIX (neste caso 20 µg de cada peptídeo, resultando em 60 µg a cada imunização) destas substâncias foram emulsionados. Na primeira imunização a emulsão foi realizada com adjuvante completo de *Freund* e nas demais, utilizou-se adjuvante incompleto de *Freund*. Após a composição da emulsão o conteúdo foi inoculado na região dorsal, via subcutânea, num volume total de 100 µL. Foram aplicadas quatro doses deste antígeno nos dias 0, 30, 60 e 90 (FIGURA 2).

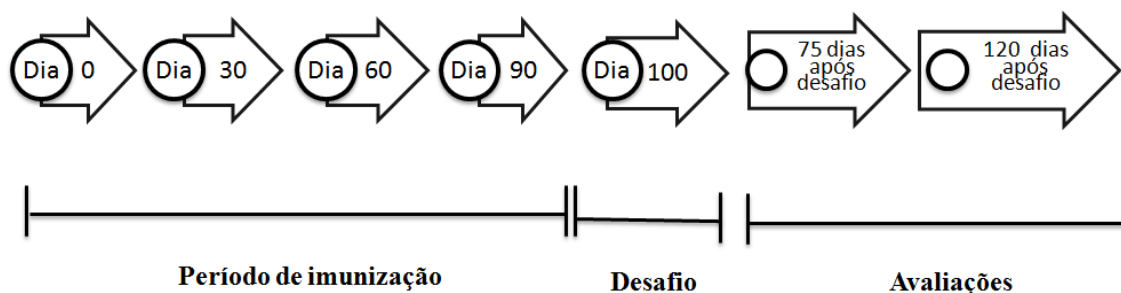
Previamente ao desafio, a cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/Cur22) foi inoculada em hamsters para que sua virulência fosse mantida. O parasito foi reisolado de lesões dos animais e cultivadas conforme descrito no item 2.4 do capítulo I desta tese.

Dez dias após a última imunização, os animais foram desafiados com inóculo de  $10^6$  promastigotas vivos de *L. braziliensis*. A inoculação das formas promastigotas

foi realizada na pata direita traseira dos animais pela via intradérmica. Estes animais foram acompanhados quanto ao desenvolvimento de lesões, bem como monitorados por meio de leituras da espessura da pata infectada. Após 75 dias do desafio 50% dos animais foi submetido à eutanásia e foi coletado sangue para dosagem de anticorpos e células do baço, fígado e lesões para pesquisa do parasito nas lesões. Os animais que permaneceram no estudo foram eutanasiados 120 dias após o desafio.



**FIGURA 1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DEMONSTRANDO RESUMIDAMENTE AS ETAPAS DO EXPERIMENTO REALIZADO.** Sete grupos experimentais de dez animais foram formados. Os animais foram imunizados com peptídeos individuais ou combinados. O grupo 5 recebeu somente o adjuvante em veículo de imunização. O grupo 6 não recebeu imunização com os peptídeos. O grupo 7 corresponde ao controle negativo e não recebeu nenhum tipo de imunização durante todo o experimento. Após o período de imunização os animais foram desafiados com  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis*. Os animais foram eutanasiados 75 e 120 dias após o desafio e as análises foram realizadas. Nota: Pep 1: peptídeo 1, Pep 2: peptídeo 2, Pep 3: peptídeo 3, Adj: adjuvante, Controle positivo: animais que receberam somente o desafio com parasitos, Controle negativo\*: animais que não receberam inoculações e nem o desafio com parasitos.



**FIGURA 2 – CRONOGRAMA DEMONSTRANDO RESUMIDAMENTE AS ETAPAS DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL REALIZADO.**

## 2.2 ISOLAMENTO DO PARASITO POR CULTURA EM ÓRGÃOS DOS ANIMAIS DESAFIADOS

Com o intuito de avaliar a presença ou ausência de *L. braziliensis* nos animais imunizados e desafiados, células do baço, fígado e lesão cutânea dos animais foram maceradas em solução fisiológica estilizada, contendo antibiótico (Penicilina 25.000UI e estreptomicina 100 µg/µL) em ambiente estéril.

As células, após homogeneização, foram colocadas em dois frascos de meio bifásico NNN (conforme apresentado no item 2.4 do capítulo I) e repicadas semanalmente por 30 dias, para um novo tubo. Para controle de positividade uma gota do líquido era visualizada ao microscópio óptico nos aumentos de 250 e 400 x para pesquisa de *L. braziliensis* (CASTRO, 2001).

## 2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG TOTAL E DAS SUB-CLASSES IgG1 E IgG2a

A pesquisa de anticorpos IgG total e das sub-classes IgG1 e IgG2a foi avaliada por teste de imunoensaio (ELISA) sensibilizando-se placas de 96 poços com 0,5 µg de antígenos de *L. braziliensis* para verificar o perfil de resposta imune predominante nos animais de cada grupo experimental. Após incubação *overnight* a 4°C, a solução foi descartada, e realizada a lavagem, por duas vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%). Os poços foram bloqueados com 120 µL de PBS acrescido de BSA 3% por 1 hora em temperatura de 37°C. Após incubação e nova lavagem foram adicionados de soros de um *pool* de animais dos grupos 1, 2 e 3 diluídos 1:25 em BSA 1%, PBS pH 7,4, onde permaneceram por 1 hora a 37°C. A placa foi então lavada e foi adicionado o conjugado anti-IgG de hamster específico-biotina (1 µg/mL) por 1 hora a 37°C. Depois de novas lavagens foram adicionados 100 µL de neutravidina ligada a peroxidase (diluída 1:8.000) e foi realizada a incubação das placas por 1 hora a 37°C. Novas lavagens foram efetuadas seguidas da adição de cromógeno composto por uma pastilha de OPD (2

mg) diluídas em 10 mL de tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e 2 µl de peróxido de hidrogênio a 30% aplicado e mantido em ambiente escuro por 15 minutos. A parada da reação aconteceu com adição de 20 µL de uma solução de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em leitor de microplaca em 492 nm.

### 3 RESULTADOS

Na avaliação da enduração da lesão da pata foi possível observar que 75 dias após o desafio com *L. braziliensis* apenas dois animais apresentaram lesões características de leishmaniose experimental (FIGURA 3, TABELA 1). Já 120 dias após o desafio todos os animais do grupo controle positivo apresentaram lesões características, enquanto que os animais imunizados com os peptídeos tiveram menor número de lesões ou não apresentaram lesões (FIGURA 3 e TABELA 1 e 2). Os animais do grupo controle negativo, como esperado, não apresentaram lesão em nenhum período do estudo.



FIGURA 3 – LESÕES TÍPICAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM HAMSTER, 120 DIAS APÓS O DESAFIO COM  $10^6$  CEPAS DE *L. braziliensis*.

**TABELA 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS E LESÕES CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL EM HAMSTERS 75 DIAS APÓS O DESAFIO**

	<b>Número de animais com lesões</b>	<b>% de animais com lesão (infecção)</b>
<b>Grupo 1:</b> Pep 1	1/5	20
<b>Grupo 2:</b> Pep 2	0/5	0
<b>Grupo 3:</b> Pep 3	0/5	0
<b>Grupo 4:</b> MIX dos três peptídeos	0/5	0
<b>Grupo 5:</b> Adjuvante e desafio	0/5	0
<b>Grupo 6:</b> Controle positivo	1/5	20
<b>Grupo 7:</b> Controle negativo	0/5	0

\*As premissas dos testes estatísticos não permitem analisar os dados de proporção de lesão/proteção dos diferentes grupos. Pep 1 (peptídeo 1), Pep 2 (peptídeo 2), Pep3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3). Controle negativo: Grupo que não recebeu nenhuma imunização durante o experimento. Controle positivo: animais que receberam somente o desafio com o parasito.

**TABELA 2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS E LESÕES CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL EM HAMSTERS 120 DIAS APÓS O DESAFIO**

	<b>Número de animais com lesões</b>	<b>% de animais com lesão (infecção)</b>	<b>% de proteção</b>
<b>Grupo 1:</b> Pep 1	1/4	25	75
<b>Grupo 2:</b> Pep 2	<b>0/5</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>Grupo 3:</b> Pep 3	2/5	40	60
<b>Grupo 4:</b> MIX dos três peptídeos	1/5	20	80
<b>Grupo 5:</b> Adjuvante e desafio	1/3	33	66
<b>Grupo 6:</b> Controle positivo	5/5	<b>100</b>	-
<b>Grupo 7:</b> Controle negativo	<b>0/4</b>	0	-

\*As premissas dos testes estatísticos não permitem analisar os dados de proporção de lesão/proteção dos diferentes grupos. Pep 1 (peptídeo 1), Pep 2 (peptídeo 2), Pep3 (peptídeo 3), MIX (P1+P2+P3). Controle negativo: Grupo que não recebeu nenhuma imunização durante o experimento. Controle positivo: animais que receberam somente o desafio com o parasito.

Após 75 dias do desafio com promastigotas vivas de *L. braziliensis* a cultura dos órgãos dos animais eutanasiados revelou a presença do parasito no baço de um animal do grupo 1 e na lesão cutânea de um animal do grupo 6. Já 120 dias após o desafio, *L. braziliensis* foi detectada nos grupos experimentais 1, 3, 4, 5 e 6 (TABELA 3). No grupo 2 não foram observados parasitos, corroborando com os

dados obtidos na análise macroscópica deste grupo de animais onde não foram observadas lesões típicas de leishmaniose.

TABELA 3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS REFERENTES À PRESENÇA DE *Leishmania braziliensis* NOS TECIDOS ANIMAIS APÓS CULTURA

Grupos Experimentais	75 dias após o desafio	120 dias após o desafio	Tecidos positivos
1	1/5	2/4	1 baço e 1 fígado
2	0/5	<b>0/5</b>	-
3	0/5	1/5	1 baço
4	0/5	2/5	1 baço e 1 lesão
5	1/5	1/5	1 baço
6	1/5	5/5	3 baço e 2 lesão
7	0/5	<b>0/5</b>	-

Na FIGURA 4 são apresentados os dados referentes à produção de IgG total e IgG2a no soro de animais imunizados com os peptídeos e posteriormente desafiados com os parasitos. Já em relação a IgG1 não foram detectados títulos no soro dos animais e novos testes necessitam ser realizados. 75 dias após o desafio, todos os grupos experimentais produziram anticorpos IgG e IgG2a (FIGURA 4a). Já 120 dias após o desafio verificou-se produção aumentada de IgG e IgG2a nos grupos 1, 3, 4, 5 e 6 contrastando com a diminuição tanto de IgG total quanto de IgG2a no grupo 2 (FIGURA 4b).

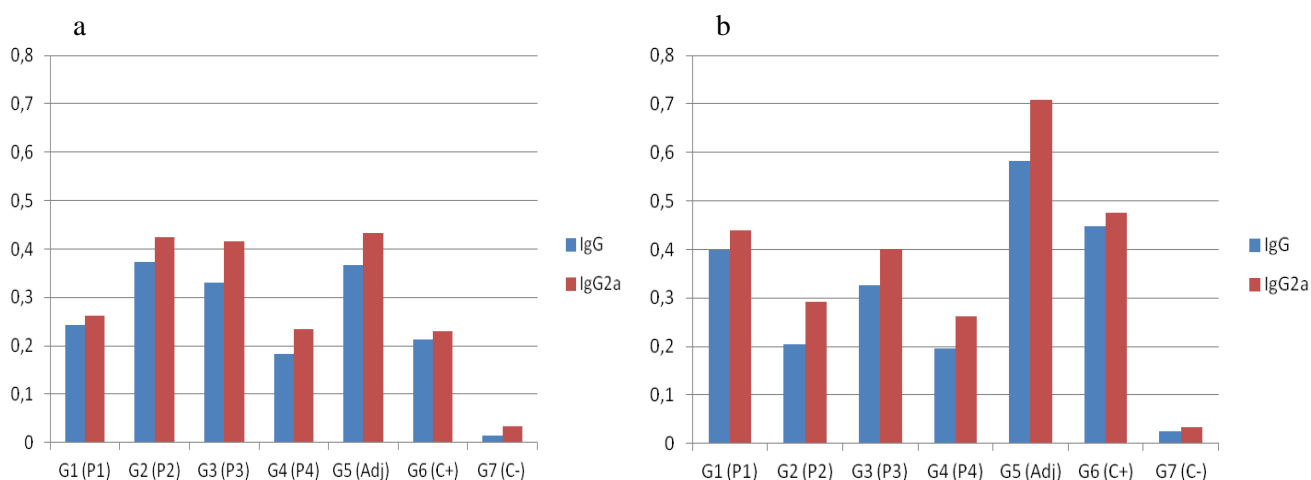


FIGURA 4 - PRODUÇÃO DE IgG E IgG2a POR ANIMAIS IMUNIZADOS COM OS PEPTÍDEOS ISOLADOS OU EM MIX E POSTERIORMENTE DESAFIADOS COM *L. braziliensis*. **4a**: dosagem 75 dias após o desafio, **4b**: dosagem 120 dias após o desafio.



## 4 DISCUSSÃO

A proteção induzida pela imunização com os três peptídeos sintéticos ou o MIX dos mesmos é associada à presença ou ausência de lesões características da leishmaniose experimental. Após 120 dias do desafio com promastigotas de *L. braziliensis* os animais do grupo que recebeu o peptídeo 2 não apresentaram lesões de leishmaniose experimental. Desta forma considera-se que o peptídeo dois foi capaz de induzir proteção em hamsters contra a leishmaniose experimental. Os demais peptídeos também foram capazes de proteger 60 a 80% dos animais. Neste estudo verificou-se ainda que alguns animais que receberam somente o adjuvante apresentaram proteção de 66% contra a doença em questão. Este fato pode estar relacionado à imunização com adjuvante completo de Freund. Corroborando com estes resultados, uma vacina elaborada pela combinação de formas promastigotas mortas de *L. mexicana* ou *L. braziliensis* juntamente com *Mycobacterium bovis* de BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*) apresentou atividade profilática e terapêutica contra a leishmaniose humana. Quando usada para fins terapêuticos a vacina induziu a cura de pacientes, acompanhada da indução da resposta imune do tipo Th1, produção da citocina IFN- $\gamma$  e ausência da citocina IL-4 (CASTES, 1989; CABRERA *et al.*, 2000).

No Irã uma vacina composta por *L. major* morta mais BCG demonstrou pouca diferença no desenvolvimento da doença entre o grupo vacinado com BCG sozinho e o grupo imunizado com BCG mais a vacina, sugerindo que o BCG leva à proteção parcial contra a leishmaniose (MOMENI *et al.*, 1999).

Um pré-requisito para uma boa resposta imune é um estado de inflamação no local do corpo onde os antígenos são injetados. Em geral, a imunização com peptídeos purificados leva a uma resposta imune fraca. Embora estes peptídeos sejam antígenos reais, que, em princípio podem ser reconhecidos pelo sistema imune e provocar a formação de anticorpos específicos. Uma resposta a estes antígenos pode ser reforçada por substâncias que induzem a inflamação por mecanismos independentes do antígeno. Estas substâncias de reforço são chamadas adjuvantes (PARHAM, 2011).

Em imunologia experimental a substância mais efetiva para esta finalidade é o adjuvante completo de Freund, uma emulsão de micobactérias mortas em óleo mineral em que os antígenos são vigorosamente misturados. As características físicas da emulsão causam o agregado e a precipitação das proteínas solúveis formando partículas. Isso previne o adjuvante e o antígeno de serem rapidamente dispersos e degradados pelo corpo e prove ao sistema imune um estímulo localizado e persistente (PARHAM, 2011).

Spitzer e colaboradores (1999), utilizando um peptídeo sintético derivado da GP63 e sintetizado pela técnica FMOC, obtiveram proteção de camundongos contra cepas virulentas de *L. major*. Os peptídeos foram inoculados subcutaneamente e, no entanto, o grupo que recebeu somente o adjuvante (poloxamero 407) também apresentou proteção em 6 dos 8 animais do grupo experimental (6 animais livres de lesões por até dez meses depois da inoculação). Esta proteção pode ser explicada pela característica do poloxamero de induzir uma resposta imune Th1 e atrair macrófagos para o local da lesão.

Linfócitos Th1 e Th2 participam da diferenciação dos isotipos de imunoglobulinas. O nível de anticorpos IgG1 correlaciona-se com o tipo de resposta imune Th2 enquanto que os anticorpos IgG2a indicam uma resposta imune polarizada para o perfil Th1 (SNAPPER e PAUL, 1987; COFFMAN *et al.*, 1993).

Constatou-se a produção de anticorpos anti-peptídeos em todos os grupos de animais estudados, representando a imunogenicidade destas moléculas. Interessantemente, no grupo que recebeu o peptídeo 2, foi observada a diminuição dos anticorpos IgG totais e IgG2a 120 dias após o desafio com os peptídeos sintéticos. Neste grupo também não foram verificadas lesões características de leishmaniose experimental. Esta ausência relaciona-se com a diminuição dos níveis de anticorpos, já que em animais em processo de convalescença ocorre diminuição do título de anticorpos específicos (MONTENEGRO, 1926).

Um aumento de imunoglobulinas da subclasse IgG2a (que está relacionada ao perfil Th1 de resposta imune) também é observado em todos os grupos. Já em relação a IgG não se observou este aumento. Estes dados ainda não são suficientes para revelar o tipo de resposta imune que está sendo desencadeado. Uma informação essencial para a conclusão deste experimento seria a dosagem de citocinas, experimento possível e encontra-se em etapa de finalização.

Salay e colaboradores (2007) avaliaram a administração de dois peptídeos sintéticos inoculados com Adjuvante Completo e Incompleto de Freund com posterior desafio dos camundongos Balb/c com *L. braziliensis*, sendo que os autores não verificaram proteção (redução no tamanho das lesões nos animais imunizados comparados aos animais controle) e nem mesmo a detecção aumentada dos níveis da citocina IFN- $\gamma$ .

Fumagalli e colaboradores (2008) verificaram proteção de camundongos vacinados com peptídeos sintéticos (obtidos pela técnica de *Phage display*) após o desafio foi realizado com *L. amazonensis* em camundongos Balb/c. Esta proteção foi relacionada à produção elevada de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-4, IL-10 após o desafio, reduções significativas no tamanho médio das lesões e níveis mais baixos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos ao parasita.

Existe uma tendência mundial para reavaliar a utilização de animais nos experimentos que objetiva além de diminuir o número de animais, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo*. Em relação à redução do número de animais, como não foi possível diminuir as variáveis do desenho experimental proposto e visando a aplicação do Princípio Humanitário da Experimentação Animal, denominado Princípio dos 3 Rs (*replacement, reduction e refinement*) foram definidos como dez o número de animais por grupo experimental (DAMY *et al.*, 2010).

A publicação de resultados experimentais, mesmo que não tenham significância estatística, é fundamental para assegurar a não redundância de estudo. A variabilidade da amostra pode ser reduzida usando animais genética e sanitariamente homogêneos, além de controlar variáveis ambientais. Procedimentos padronizados, métodos acurados para medir as respostas e objetivos bem definidos permitem aceitar ou rejeitar a hipótese inicial, mesmo com o número de animais reduzido (DAMY *et al.*, 2010).

Os resultados referentes ao emprego dos peptídeos sintéticos como estratégia de imunização são promissores (60 a 100% de proteção) e apontam novas perspectivas para aplicação destas moléculas em testes vacinais, principalmente quando observadas as porcentagens de proteção contra leishmaniose experimental nos animais que receberam imunização com o peptídeo 2 e com o MIX de peptídeos disponíveis.

## 5 CONCLUSÕES

Os peptídeos demonstraram-se imunogênicos pois induziram a produção de anticorpos anti-peptídeos nos animais que receberam imunizações com estas moléculas.

Imunoproteção foi observada pela administração principalmente do peptídeo 2, que atuou também na diminuição dos níveis de anticorpos específicos e na redução na visualização de parasitos nas culturas dos tecidos animais.

Os peptídeos 1, 3 e o MIX foram capazes de proteger 60 a 80% dos animais.

## 6 PERSPECTIVAS

A realização da dosagem de diferentes citocinas por PCR em tempo real é uma etapa desejável para conclusão deste estudo, visto que poderá auxiliar na revelação do perfil de resposta imune desencadeado pela imunização de animais com os peptídeos aqui avaliados. Esta etapa é possível de realização visto que fragmentos do baço dos animais imunizados e posteriormente desafiados foram retirados no momento da eutanásia e encontram-se armazenados em solução estabilizadora de RNase a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A realização de um novo experimento de imunização de Hamsters com os peptídeos, agora em maior número de animais que serão mantidos por um período de 120 dias ou mais após desafio possibilitará a realização de testes estatísticos ainda necessários para conclusão final deste capítulo. Neste novo experimento pode-se testar ainda diferentes doses de antígenos para a imunização dos animais, novos adjuvantes ou direntes composições do adjuvante já avaliado nesta tese. Ainda seria interessante a avaliação de combinações dos peptídeos sintéticos em ensaio de imunoprevenção.

## REFERÊNCIAS

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotas by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10-13, p. 1097–1106, aug. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2010.

CABRERA, M. J. M. *et al.* Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. **Parasite Immunology**, v. 22, n. 2, p. 73-79, feb. 2000.

CASTES, M. *et al.* Cell-mediated immunity in localized cutaneous leishmaniasis patients before and after treatment with immunotherapy or chemotherapy. **Parasite Immunology**, v. 11, n. 3, p. 211-222, may. 1989.

COFFMAN, R., LEBMAN, D. A., ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Advances in Immunology**, v. 54, p. 229-270, 1993.

DAMY, S. B. *et al.* Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**; v. 56, p. 103-111, jan. 2010.

DEDET, J. P. Leishmaniasis: a growing problem due to environmental changes and human behaviours. **Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine**, v. 191, n. 8, p. 1579-1587, nov. 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, sept. 2004.

DUMONTEIL, E. Vaccines against protozoan parasites: Advances and Challenges. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 6, jun. 2007.

FOLLADOR, I, *et al.* Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Vaccine**, v. 31, n. 9-10, p. 1365-1368, jan. 2002.

FUMAGALLI, M. A. C. **Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *Phage display* e *spot synthesis***. 85 f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

GAMBOA, D. K. *et al.* Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. **Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 319-326, mar. 2008.

IBORRA, S. *et al.* The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6562-6572, nov. 2003.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LOUIS, J. *et al.* Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 4, p. 459-464, aug. 1998.

MENDEZ, S. *et al.*, The potency and durability of DNA - and protein - based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 5122-5128, apr. 2001.

MILES, S. A. *et al.* A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **The Journal of experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 747-754, mar. 2005.

MOMENI, A. Z. *et al.* A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, v. 17, n. 5, p. 466-472, feb. 1999.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed, 2011.

PESSOA, S. B.; PESTANA, B. R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. **Revista de Biologia e Higiene**, v. 10, p. 112-118, 1941.

SALAY, G. *et al.* Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1173-1180, jul. 2007.

SJOLANDER, A. *et al.* Vaccination with recombinant parasite surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 2077-2084, dec. 1998.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B-cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-947, may. 1987.

SPITZER, N. *et al.* Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. **Vaccine**, v. 17, n. 11-12, p. 1298-1300, mar. 1999.

STAGER, S. J. *et al.* Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine induced CD8+ T-cell responses. **Nature Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1287-1292, oct. 2003.

WALKER, P. S. *et al.* Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. **Human Gene Therapy**, v. 9, n. 13, p. 1899-1907, sep. 1998.

WOELBING, S. *et al.* Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **The Journal of experimental Medicine**, v. 203, n. 1, p. 177-188, jan. 2006.

XU, D.; LIEW, F. Y. Genetic vaccination against leishmaniasis, **Vaccine**, v. 12, n. 16, p. 1534-1536, dec. 1994.

XU, D.; LIEW, F. Y. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. **Immunology**, v. 84, n. 2, p. 173-176, feb. 1995.



# APÊNDICES

**APÊNDICE 1: ABSORBÂNCIAS DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL FRENTE AO SORO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS EM TESTE ELISA INDIRETO (2SD)**

Amostra	P-1	P-2	P-3	MIX	AS
N1	0,345	0,247	0,195	0,264	0,095
N2	0,260	0,322	0,235	0,159	0,058
N3	0,251	0,238	0,168	0,157	0,055
N4	0,216	0,234	0,134	0,112	0,074
N5	0,289	0,194	0,179	0,158	0,032
N6	0,260	0,256	0,174	0,161	0,050
N7	0,225	0,253	0,150	0,160	0,024
N8	0,272	0,239	0,170	0,167	0,136
N9	0,320	0,265	0,266	0,285	0,229
N10	0,303	0,376	0,193	0,192	0,004
N11	0,298	0,258	0,191	0,184	0,042
N12	0,195	0,259	0,129	0,130	0,034
N13	0,330	0,179	0,268	0,187	0,027
N14	0,308	0,296	0,213	0,233	0,050
N15	0,264	0,327	0,223	0,181	0,033
N16	0,237	0,242	0,136	0,143	0,094
N17	0,227	0,237	0,198	0,134	0,030
N18	0,275	0,197	0,195	0,134	0,026
N19	0,323	0,249	0,198	0,186	0,039
N20	0,254	0,274	0,154	0,141	0,044
N21	0,288	0,244	0,173	0,132	0,075
N22	0,288	0,245	0,255	0,139	0,064
N23	0,349	0,303	0,219	0,217	0,020
N24	0,246	0,311	0,156	0,225	0,079
N25	0,274	0,209	0,172	0,146	0,028
N26	0,309	0,234	0,211	0,162	0,060
N27	0,317	0,278	0,201	0,190	0,094
N28	0,361	0,234	0,286	0,200	0,053
N29	0,306	0,319	0,230	0,234	0,078
N30	0,351	0,259	0,230	0,188	0,029
N31	0,314	0,317	0,212	0,259	0,016
N32	0,270	0,258	0,244	0,163	0,059
N33	0,247	0,244	0,165	0,152	0,052
N34	0,243	0,191	0,227	0,140	0,037
N35	0,224	0,205	0,123	0,144	0,025
N36	0,228	0,177	0,126	0,139	0,101
N37	0,238	0,175	0,146	0,176	0,015
<b>Cut-off</b>	<b>0,361</b>	<b>0,344</b>	<b>0,279</b>	<b>0,250</b>	<b>0,109</b>
<b>Média</b>	0,278	0,252	0,193	0,175	0,049
<b>Desv pad</b>	0,043	0,046	0,043	0,041	0,029
<b>+</b>	1	1	1	3	1

**APÊNDICE 2: ABSORBÂNCIA DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL CONTRA O SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM TESTE ELISA INDIRETO – GRUPO 1 (2SD)**

	P-1	P-2	P-3	MIX	AS	TODOS	2 OU +	NEG AS	NEG PEP
1	0,601	0,541	0,415	0,372	0,545	X	X		
2	0,363	0,314	0,279	0,227	0,349		X		
3	0,481	0,417	0,307	0,326	0,738	X	X		
4	0,391	0,354	0,246	0,215	0,309		X		
5	0,546	0,547	0,385	0,390	0,415	X	X		
6	0,406	0,373	0,255	0,210	0,326		X		
7	0,285	0,270	0,215	0,146	0,120				X
8	0,444	0,406	0,318	0,345	0,561	X	X		
9	0,249	0,217	0,154	0,186	0,111				X
10	0,415	0,348	0,241	0,300	1,102		X		
11	0,324	0,292	0,199	0,175	0,261				X
12	0,373	0,344	0,226	0,273	0,261		X		
13	0,311	0,275	0,196	0,217	0,512				X
14	0,585	0,512	0,391	0,431	0,132	X	X		
15	0,397	0,360	0,226	0,222	0,031		X	X	
16	0,312	0,275	0,382	0,234	0,369		X		
17	0,253	0,228	0,168	0,160	0,109				X
18	0,125	0,103	0,075	0,059	0,343				X
19	0,483	0,458	0,311	0,354	0,766	X	X		
20	0,030	0,042	0,019	0,018	0,014			X	X
21	0,086	0,078	0,131	0,052	0,058			X	X
22	0,506	0,473	0,343	0,212	0,842		X		
23	0,662	0,563	0,474	0,462	0,047		X	X	
24	0,460	0,393	0,301	0,276	0,531	X	X		
25	0,361	0,311	0,219	0,198	0,067			X	
<b>Cut-off</b>	<b>0,361</b>	<b>0,344</b>	<b>0,278</b>	<b>0,255</b>	<b>0,109</b>				
<b>TOTAL +</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
<b>%</b>	<b>64</b>	<b>56</b>	<b>44</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>28</b>	<b>64</b>	<b>20</b>	<b>32</b>

**APÊNDICE 3: ABSORBÂNCIA DOS PEPTÍDEOS CONTRA O SORO DE INDIVÍDUOS COM SUSPEITA DE LTA EM TESTE ELISA INDIRETO - GRUPO 2 (2SD)**

	P-1	P-2	P-3	MIX	AS	+ EM TODOS	+ EM DOIS OU +	NEG AS	NEG PEP
1	0,601	0,541	0,415	0,372	0,545	X	X		
2	0,363	0,314	0,279	0,227	0,349		X		
3	0,481	0,417	0,307	0,326	0,738	X	X		
4	0,391	0,354	0,246	0,215	0,309		X		
5	0,546	0,547	0,385	0,390	0,415	X	X		
6	0,406	0,373	0,255	0,210	0,326		X		
7	0,285	0,270	0,215	0,146	0,120				X
8	0,444	0,406	0,318	0,345	0,561	X	X		
9	0,249	0,217	0,154	0,186	0,111				X
10	0,415	0,348	0,241	0,300	1,102		X		
11	0,324	0,292	0,199	0,175	0,261				X
12	0,373	0,344	0,226	0,273	0,261		X		
13	0,311	0,275	0,196	0,217	0,512				X
14	0,585	0,512	0,391	0,431	0,132	X	X		
15	0,397	0,360	0,226	0,222	0,031			X	
16	0,312	0,275	0,382	0,234	0,369		X		
17	0,253	0,228	0,168	0,160	0,109				X
18	0,125	0,103	0,075	0,059	0,343				X
19	0,483	0,458	0,311	0,354	0,766	X	X		
20	0,030	0,042	0,019	0,018	0,014			X	X
21	0,086	0,078	0,131	0,052	0,058			X	X
22	0,506	0,473	0,343	0,212	0,842		X		
23	0,662	0,563	0,474	0,462	0,047		X	X	
24	0,460	0,393	0,301	0,276	0,531	X	X		
25	0,361	0,311	0,219	0,198	0,067			X	
26	0,394	0,316	0,227	0,288	0,673		X		
27	0,429	0,383	0,241	0,258	0,212		X		
28	0,221	0,223	0,313	0,160	0,512		X		
29	0,387	0,299	0,215	0,267	0,212		X		
30	0,451	0,385	0,278	0,301	0,320	X	X		
31	0,306	0,215	0,180	0,257	0,689		X		
32	0,517	0,457	0,320	0,403	0,435	X	X		
33	0,209	0,169	0,137	0,122	0,556				X
34	0,421	0,352	0,264	0,281	0,516		X		
35	0,363	0,346	0,221	0,259	0,390		X		
36	0,431	0,391	0,278	0,345	0,551	X	X		
37	0,429	0,376	0,286	0,311	0,467	X	X		
38	0,477	0,397	0,305	0,333	0,502	X	X		
39	0,343	0,244	0,178	0,233	0,474				X
40	0,506	0,433	0,428	0,311	0,568	X	X		
41	0,479	0,421	0,301	0,286	0,311	X	X		

42	0,518	0,424	0,323	0,318	0,724	X	X		
43	0,491	0,435	0,314	0,300	0,826	X	X		
44	0,453	0,419	0,294	0,312	0,298	X	X		
45	0,516	0,485	0,323	0,347	0,406	X	X		
46	0,302	0,260	0,192	0,192	0,223				X
47	0,413	0,335	0,279	0,268	0,268	X	X		
48	0,532	0,046	0,373	0,334	0,438		X		
49	0,386	0,527	0,256	0,208	0,317		X		
50	0,435	0,363	0,285	0,282	0,527	X	X		
51	0,333	0,434	0,236	0,171	0,581		X		
52	0,491	0,326	0,320	0,367	0,242		X		
53	0,455	0,461	0,319	0,316	0,414	X	X		
54	0,501	0,469	0,309	0,307	0,287	X	X		
55	0,571	0,441	0,383	0,412	0,639	X	X		
56	0,854	0,543	0,559	0,652	0,261	X	X		
57	0,420	0,745	0,252	0,231	0,256		X		
<b>Cut-off</b>	<b>0,361</b>	<b>0,344</b>	<b>0,278</b>	<b>0,255</b>	<b>0,107</b>				
TOTAL+	42	37	31	35	52	24	44	5	11
%	74	65	54	61	91	42	77	8	19

**APÊNDICE 4: ABSORBÂNCIA DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL FRENTE O SORO DE PACIENTES COM TUBERCULOSE (T), HANSENÍASE (H) E DOENÇA DE CHAGAS (C) EM TESTE ELISA INDIRETO (2SD)**

	<b>P-1</b>	<b>P-2</b>	<b>P-3</b>	<b>MIX</b>	<b>AS</b>
<b>C1</b>	0,088	0,114	0,090	0,046	0,033
<b>C2</b>	0,135	0,199	0,206	0,070	0,150
<b>C3</b>	0,237	0,300	0,286	0,046	0,141
<b>C4</b>	0,089	0,123	0,242	0,046	0,551
<b>C5</b>	0,073	0,094	0,059	0,055	0,544
<b>C6</b>	0,111	0,162	0,137	0,073	0,614
<b>C7</b>	0,146	0,218	0,191	0,086	0,028
<b>C8</b>	0,054	0,077	0,060	0,064	0,021
<b>C9</b>	0,311	0,389	0,386	0,032	0,011
<b>C10</b>	0,057	0,064	0,069	0,061	0,273
<b>H1</b>	0,181	0,227	0,231	0,143	0,017
<b>H2</b>	0,274	0,361	0,285	0,110	0,033
<b>H3</b>	0,261	0,304	0,277	0,202	0,048
<b>H4</b>	0,193	0,265	0,228	0,052	0,040
<b>H5</b>	0,175	0,238	0,156	0,131	0,302
<b>H6</b>	0,207	0,263	0,226	0,084	0,051
<b>H7</b>	0,375	0,286	0,265	0,176	0,033
<b>H8</b>	0,339	0,404	0,285	0,089	0,046
<b>H9</b>	0,141	0,220	0,220	0,279	0,726
<b>H10</b>	0,250	0,333	0,163	0,112	0,019
<b>T1</b>	0,239	0,303	0,211	0,234	0,046
<b>T2</b>	0,088	0,103	0,041	0,034	0,036
<b>T3</b>	0,399	0,455	0,520	0,387	0,007
<b>T4</b>	0,208	0,253	0,221	0,185	0,044
<b>T5</b>	0,365	0,322	0,300	0,253	0,060
<b>T6</b>	0,134	0,155	0,137	0,087	0,022
<b>T7</b>	0,188	0,245	0,230	0,176	0,024
<b>T8</b>	0,474	0,521	0,507	0,452	0,021
<b>T9</b>	0,170	0,194	0,148	0,125	0,023
<b>T10</b>	0,043	0,083	0,068	0,014	0,016
<b>Cut-off</b>	<b>0,361</b>	<b>0,344</b>	<b>0,278</b>	<b>0,255</b>	<b>0,107</b>
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>8</b>
	<b>1C</b>	<b>1C</b>	<b>2C</b>	<b>0C</b>	<b>6C</b>
	<b>1H</b>	<b>2H</b>	<b>2H</b>	<b>1H</b>	<b>2H</b>
	<b>3T</b>	<b>2T</b>	<b>3T</b>	<b>2T</b>	<b>0T</b>

**APÊNDICE 5: ABSORBÂNCIA DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL CONTRA O SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM TESTE ELISA INDIRETO – GRUPO 1 (**CUT-OFF COM CURVA ROC**)**

	P-1	P-2	P-3	MIX	AS	TODOS	2 OU +	NEG AS	NEG PEP
1	0,601	0,541	0,415	0,372	0,545	X	X		
2	0,363	0,314	0,279	0,227	0,349		X		
3	0,481	0,417	0,307	0,326	0,738	X	X		
4	0,391	0,354	0,246	0,215	0,309	X	X		
5	0,546	0,547	0,385	0,390	0,415	X	X		
6	0,406	0,373	0,255	0,210	0,326	X	X		
7	0,285	0,270	0,215	0,146	0,120				X
8	0,444	0,406	0,318	0,345	0,561	X	X		
9	0,249	0,217	0,154	0,186	0,111				X
10	0,415	0,348	0,241	0,300	1,102	X	X		
11	0,324	0,292	0,199	0,175	0,261				X
12	0,373	0,344	0,226	0,273	0,261		X		
13	0,311	0,275	0,196	0,217	0,512		X		
14	0,585	0,512	0,391	0,431	0,132	X	X		
15	0,397	0,360	0,226	0,222	0,031		X	X	
16	0,312	0,275	0,382	0,234	0,369		X		
17	0,253	0,228	0,168	0,160	0,108				X
18	0,125	0,103	0,075	0,059	0,343				X
19	0,483	0,458	0,311	0,354	0,766	X	X		X
20	0,030	0,042	0,019	0,018	0,014			X	X
21	0,086	0,078	0,131	0,052	0,058			X	X
22	0,506	0,473	0,343	0,212	0,842	X	X		
23	0,662	0,563	0,474	0,462	0,047		X	X	
24	0,460	0,393	0,301	0,276	0,531	X	X		
25	0,361	0,311	0,219	0,198	0,067		X	X	
<i>Cut-off</i>	<b>0,351</b>	<b>0,327</b>	<b>0,235</b>	<b>0,192</b>	<b>0,101</b>				
TOTAL+	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
%	<b>64</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>72</b>	<b>80</b>	<b>44</b>	<b>72</b>	<b>20</b>	<b>28</b>

**APÊNDICE 6: ABSORBÂNCIA DOS PEPTÍDEOS CONTRA O SORO DE INDIVÍDUOS COM SUSPEITA DE LTA EM TESTE ELISA INDIRETO – GRUPO 2 (CUT-OFF COM CURVA ROC)**

	P-1	P-2	P-3	MIX	AS	+ EM TODOS	NEG AS	NEG PEP
1	0,601	0,541	0,415	0,372	0,545	X		
2	0,363	0,314	0,279	0,227	0,349			
3	0,481	0,417	0,307	0,326	0,738	X		
4	0,391	0,354	0,246	0,215	0,309	X		
5	0,546	0,547	0,385	0,390	0,415	X		
6	0,406	0,373	0,255	0,210	0,326	X		
7	0,285	0,270	0,215	0,146	0,120			X
8	0,444	0,406	0,318	0,345	0,561	X		
9	0,249	0,217	0,154	0,186	0,111			X
10	0,415	0,348	0,241	0,300	1,102	X		
11	0,324	0,292	0,199	0,175	0,261			X
12	0,373	0,344	0,226	0,273	0,261			
13	0,311	0,275	0,196	0,217	0,512			
14	0,585	0,512	0,391	0,431	0,132	X		
15	0,397	0,360	0,226	0,222	0,031		X	
16	0,312	0,275	0,382	0,234	0,369			
17	0,253	0,228	0,168	0,160	0,108			X
18	0,125	0,103	0,075	0,059	0,343			X
19	0,483	0,458	0,311	0,354	0,766	X		
20	0,030	0,042	0,019	0,018	0,014		X	X
21	0,086	0,078	0,131	0,052	0,058		X	X
22	0,506	0,473	0,343	0,212	0,842	X		
23	0,662	0,563	0,474	0,462	0,047	X	X	
24	0,460	0,393	0,301	0,276	0,531	X		
25	0,361	0,311	0,219	0,198	0,067		X	
26	0,394	0,316	0,227	0,288	0,673			
27	0,429	0,383	0,241	0,258	0,212	X		
28	0,221	0,223	0,313	0,160	0,512			
29	0,387	0,299	0,215	0,267	0,212			
30	0,451	0,385	0,278	0,301	0,320	X		
31	0,306	0,215	0,180	0,257	0,689			
32	0,517	0,457	0,320	0,403	0,435	X		
33	0,209	0,169	0,137	0,122	0,556			X
34	0,421	0,352	0,264	0,281	0,516	X		
35	0,363	0,346	0,221	0,259	0,390			
36	0,431	0,391	0,278	0,345	0,551	X		
37	0,429	0,376	0,286	0,311	0,467	X		
38	0,477	0,397	0,305	0,333	0,502	X		
39	0,343	0,244	0,178	0,233	0,474			
40	0,506	0,433	0,428	0,311	0,568	X		



41	0,479	0,421	0,301	0,286	0,311	X		
42	0,518	0,424	0,323	0,318	0,724	X		
43	0,491	0,435	0,314	0,300	0,826	X		
44	0,453	0,419	0,294	0,312	0,298	X		
45	0,516	0,485	0,323	0,347	0,406	X		
46	0,302	0,260	0,192	0,192	0,223			X
47	0,413	0,335	0,279	0,268	0,268	X		
48	0,532	0,046	0,373	0,334	0,438			
49	0,386	0,527	0,256	0,208	0,317	X		
50	0,435	0,363	0,285	0,282	0,527	X		
51	0,333	0,434	0,236	0,171	0,581			
52	0,491	0,326	0,320	0,367	0,242			
53	0,455	0,461	0,319	0,316	0,414	X		
54	0,501	0,469	0,309	0,307	0,287	X		
55	0,571	0,441	0,383	0,412	0,639	X		
56	0,854	0,543	0,559	0,652	0,261	X		
57	0,420	0,745	0,252	0,231	0,256	X		
<b>Cut-off</b>	<b>0,361</b>	<b>0,327</b>	<b>0,235</b>	<b>0,200</b>	<b>0,101</b>			
TOTAL	42	37	39	45	52	33	5	9
%	74	65	68	79	91	58	8	15

**APÊNDICE 7: ABSORBÂNCIA DOS PEPTÍDEOS E DO ANTÍGENO SOLÚVEL FRENTE O SORO DE PACIENTES COM TUBERCULOSE (T) , HANSENÍASE (H) E DOENÇA DE CHAGAS (C) EM TESTE ELISA INDIRETO (**CUT-OFF COM CURVA ROC**)**

	<b>P-1</b>	<b>P-2</b>	<b>P-3</b>	<b>MIX</b>	<b>AS</b>
<b>C1</b>	0,088	0,114	0,090	0,046	0,033
<b>C2</b>	0,135	0,199	0,206	0,070	0,150
<b>C3</b>	0,237	0,300	0,286	0,046	0,141
<b>C4</b>	0,089	0,123	0,242	0,046	0,551
<b>C5</b>	0,073	0,094	0,059	0,055	0,544
<b>C6</b>	0,111	0,162	0,137	0,073	0,614
<b>C7</b>	0,146	0,218	0,191	0,086	0,028
<b>C8</b>	0,054	0,077	0,060	0,064	0,021
<b>C9</b>	0,311	0,389	0,386	0,032	0,011
<b>C10</b>	0,057	0,064	0,069	0,061	0,273
<b>H1</b>	0,181	0,227	0,231	0,143	0,017
<b>H2</b>	0,274	0,361	0,285	0,110	0,033
<b>H3</b>	0,261	0,304	0,277	0,202	0,048
<b>H4</b>	0,193	0,265	0,228	0,052	0,040
<b>H5</b>	0,175	0,238	0,156	0,131	0,302
<b>H6</b>	0,207	0,263	0,226	0,084	0,051
<b>H7</b>	0,375	0,286	0,265	0,176	0,033
<b>H8</b>	0,339	0,404	0,285	0,089	0,046
<b>H9</b>	0,141	0,220	0,220	0,279	0,726
<b>H10</b>	0,250	0,333	0,163	0,112	0,019
<b>T1</b>	0,239	0,303	0,211	0,234	0,046
<b>T2</b>	0,088	0,103	0,041	0,034	0,036
<b>T3</b>	0,399	0,455	0,520	0,387	0,007
<b>T4</b>	0,208	0,253	0,221	0,185	0,044
<b>T5</b>	0,365	0,322	0,300	0,253	0,060
<b>T6</b>	0,134	0,155	0,137	0,087	0,022
<b>T7</b>	0,188	0,245	0,230	0,176	0,024
<b>T8</b>	0,474	0,521	0,507	0,452	0,021
<b>T9</b>	0,170	0,194	0,148	0,125	0,023
<b>T10</b>	0,043	0,083	0,068	0,014	0,016
<b>Cut-off</b>	<b>0,351 ou 0,361</b>	<b>0,327</b>	<b>0,235</b>	<b>0,192 ou 0,200</b>	<b>0,101</b>
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
	<b>0C 1H 3T</b>	<b>1C 3H 2T</b>	<b>3C 4H 3T</b>	<b>0C 1H 4T</b>	<b>6C 2H 0T</b>

# ANEXOS

# ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA COM SERES HUMANOS



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300  
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290  
Fax: (41) 317-3030  
cep@up.edu.br

**PROTOCOLO 107/2011**

## PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UP

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>		
Título: <b>Produção de Antígenos de Segunda Geração para Diagnóstico e Monitoramento de <i>Leishmania sp</i> e Leishmaniose</b>		
2. Professor orientador: Vanete Thomaz-Soccol		
3. Instituição do pesquisador: UP		
4. Local onde será realizada a pesquisa: Laboratório de pós-graduação da Universidade Positivo e Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR.		
5. Alunos(a): Juliana Seger		
CAAE: 0093.0.094.094-11		
<b>OBJETIVO</b>		
Identificar, através da técnica de Phage Display, mimó - ou epítomos específicos para anticorpos de pacientes com LTA que, após a síntese química, possam ser empregados no diagnóstico e monitoramento sorológico da <i>Leishmania sp</i> e Leishmaniose.		
<b>SÍNTESE DO PROJETO</b>		
Utilização de soro de pacientes portadores de Leishmania para identificar, mimó - ou epítomos específicos, para produção de kit diagnóstico específico para leishmaniose.		
<b>COMENTÁRIOS DO RELATOR</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• A pesquisa encontra-se em conformidade com a resolução 196/96 CNS.</li> <li>• Pesquisa de grande relevância científica e para a comunidade.</li> </ul>		
<b>PARECER FINAL</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> Recomenda a Aprovação	<input type="checkbox"/> Não Recomenda a aprovação	<input type="checkbox"/> Em pendência
➤ Solicita-se envio de relatório final, ou carta assinada comunicando término, ou cancelamento da pesquisa.		

*Wellington Zetter*  
WELLINGTON ZETTER  
COORDENADOR



**ANEXO 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA COM ANIMAIS – PARTE 1**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300  
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290  
Fax: (41) 317-3030  
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 36

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)**

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>
<i>PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE SEGUNDA GERAÇÃO PARA DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DE Leishmania sp E LEISHMANIOSE</i>
<b>PROFESSOR ORIENTADOR</b>
VANETE THOMAZ SOCCOL
<b>INSTITUIÇÃO DO PESQUISADOR</b>
Universidade Positivo
<b>ALUNOS ENVOLVIDOS</b>
JULIANA SEGER
VANETE THOMAZ SOCCOL

## ANEXO 3: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA COM ANIMAIS – PARTE 2



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300  
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290  
Fax: (41) 317-3030  
ceua@up.com.br

PROTOCOLO CEUA 36

### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - UP)

#### OBJETIVO

##### 2.1 GERAL

Identificar, através da técnica de Phage Display, mimó - ou epítopos específicos para anticorpos de pacientes com LTA que, após a síntese química, possam ser empregados no diagnóstico e monitoramento sorológico da Leishmania sp e Leishmaniose.

##### 2.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar mimó - ou epítopos a partir de uma biblioteca de peptídeos apresentados em fagos utilizando-se soros de pacientes através da técnica de Phage Display;
- Identificar as seqüências peptídicas selecionadas pela técnica de Phage Display que sejam específicas, ou seja, que não apresentem reatividade cruzada frente a anticorpos produzidos contra outros tripanosomatídeos;
- Sintetizar quimicamente e purificar as seqüências peptídicas específicas selecionadas pela técnica de Phage Display;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis quanto à possível utilização em ensaios sorológicos utilizando-se soros de pacientes LTA, Doença de Chagas e de indivíduos saudáveis;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis quanto ao estímulo da resposta imune celular e humoral em animais experimentais;
- Avaliar os peptídeos sintéticos solúveis quanto ao estímulo da resposta de linfócitos T de pacientes por quantificação de IFN- $\gamma$ ;
- Identificar, por Western Blotting, proteínas nativas de L. braziliensis resolvidas por eletroforese bidimensional quanto à reatividade frente a anticorpos anti-peptídeos sintéticos e caracterizá-las empregando-se espectrometria de massa.

#### SÍNTESE DO PROJETO

Identificação de mimó-ou epítopos, através da técnica de Phage Display, que possam ser sintetizados e avaliados quanto ao seu uso em um diagnóstico sorológico específico, como também na habilidade de estimular células T. Esta última propriedade seria de particular importância, uma vez que os peptídeos sintéticos poderiam ser uma alternativa ao emprego de Montenegro ou para outros testes sorológicos.

#### COMENTÁRIOS DO RELATOR

1. A proposta seguiu com vários itens a serem preenchidos.
2. No projeto, faltou detalhar:
  - O procedimento prático da imunização dos camundongos descrito por Niknam (2011);
  - A descrição dos animais como idade, sexo, peso.
  - Em um momento são citados camundongos, mas também hamsters;
  - O método de eutanásia não está descrito;
  - A manutenção (alimentação) dos animais não foi descrita.

#### PARECER

Recomenda a Aprovação



## ANEXO 4: ARTIGO PUBLICADO

G Model  
VETPAR-7283; No. of Pages 4

ARTICLE IN PRESS

Veterinary Parasitology xxx (2014) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

**Veterinary Parasitology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)




## Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil

Nelí Maziero<sup>a</sup>, Vanete Thomaz-Soccol<sup>a,\*</sup>, Mário Steindel<sup>b</sup>, Juliana Seger Link<sup>c</sup>,  
Diego Rossini<sup>d</sup>, Silvana M. Alban<sup>a</sup>, Aguinaldo J. Nascimento<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Programa de pós graduação em engenharia de bioprocessos e biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>c</sup> Programa de pós graduação em microbiologia, parasitologia e patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>d</sup> Clínica Veterinária e Pet Shop Canis e Felis, São Miguel do Oeste, SC, Brasil

<sup>e</sup> Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 March 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 4 June 2014

#### Keywords:

*Leishmania infantum*

Dogs

Diagnosis

Serology

PCR

### ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the occurrence of canine visceral leishmaniosis (CVL) in the far western region of Santa Catarina State, bordering Argentina and Paraná State, southern Brazil, where in recent years, VL has been recorded in both dogs and humans. Clinical signs, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR) were used for *Leishmania* investigation. Among the 252 dogs surveyed, 41 were positive by ELISA assay, 43 in IFAT (titer > 40), and 55 by PCR. From the 48 positive for VL by both serological and molecular methods, 19 (39.6%) presented clinical symptoms of leishmaniosis, 35 (72.9%) were from rural areas, and 13 (27.1%) were from urban areas. This pilot study confirms the occurrence of VL among dogs in the far western region of Santa Catarina, southern Brazil, with high risk of CVL outbreaks and presenting a threat to humans.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Short report

Visceral leishmaniosis (VL), caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Nicolle 1908, is a chronic zoonosis in which domestic dogs are a known reservoir (Cortes et al., 2012). Several epidemiological studies have shown the growing spread of the disease worldwide and in Brazil (Solano-Gallego et al., 2001; Moreno and Alvar, 2002; Alvar et al., 2004; Maia-Elkhoury et al., 2008). According to the Brazilian Health Ministry, between 1980 and 2005, a total of 59,129 human cases were recorded and 82.5% of these occurred in the northeastern region. However, the parasite

gradually spread to other regions of the country, particularly to the States of Minas Gerais, São Paulo, and Mato Grosso (Maia-Elkhoury et al., 2008). More recently, outbreaks of CVL have been recorded in southern Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and Paraná State), Paraguay, and principally in Argentina (Salomon et al., 2008; Cruz et al., 2010; Deboni et al., 2011; Dias et al., 2013; Steindel et al., 2013). It is important to highlight that hunting with dogs is a common practice in Argentina, which may be a triggering factor for disease outbreak, because the country has recorded outbreaks of CVL near the border of the states of Rio Grande do Sul and Paraná (Salomon et al., 2008; Cruz et al., 2010). Given this context, surveillance of CVL cases is important because canine infection precedes the disease in humans (Marzochi et al., 2009).

Thus, this study aimed to investigate VL occurrence among dogs in the far western region of Santa Catarina

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 33613272/+55 41 33173483; fax: +55 41 33613272/+55 4132662042.

E-mail address: [vanetesoccol@gmail.com](mailto:vanetesoccol@gmail.com) (V. Thomaz-Soccol).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.005>  
0304-4017/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.



State, Brazil. The study was conducted in the municipalities of São Miguel do Oeste and Descanso, latitude 26°43'31" and longitude 53°31'05". The climate is humid subtropical (Köppen-Geiger: Cfa; Peel et al., 2007) with an average annual temperature varying between 18 and 20 °C and annual mean rainfall varying from 2000 mm to 2400 mm (PDM, 2009).

The study was approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) under protocol number 112/2012. The minimum number of sera was calculated assuming 5% prevalence, 95% confidence interval, and 5% precision (Thrusfield, 2004). The dogs used in the VL survey were randomly sampled in rural and urban areas.

Blood samples from 252 dogs were collected by jugular venipuncture, and sera were separated and stored at –20 °C until use. Identification data from dogs (name, breed, sex, age, origin, clinical history, and presence of clinical signs) as well as the presence of forest, sylvatic or domestic animals, organic matter, water reservoirs, and sewage and garbage near the dwelling were recorded.

Three different approaches were used for VL diagnosis: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR).

Promastigotes of the reference strain *L. infantum* MHOM/FR/71/LRM75 grown at 24 °C in biphasic media brain–heart infusion broth (BHIB) were harvested from the exponential phase of growth and washed by centrifugation at 4 °C with sterile saline (0.9% and 0.3%) and PBS pH 7.2 and resuspended to a concentration of 10<sup>7</sup> promastigotes/mL. IFAT and ELISA antigen production processes were conducted as described by Castro et al. (2003) and Szargiki et al. (2009).

For ELISA, the sera samples were analyzed in 96-well flat-bottomed microtiter plates (high binding) sensitized with 500 ng/μL of protein diluted in coating buffer pH 9.6 and maintained overnight at 4 °C. After blocking with 2% casein in PBS, sera diluted 1:100 were added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. The plates were then washed six times and incubated with rabbit peroxidase-conjugated 1:2500 anti-dog immunoglobulin G (IgG) antibody (Sigma). The reaction was revealed using hydrogen peroxide and ortho-phenylenediamine (OPD) and stopped with 20 μL of 2% sulfuric acid per well. Absorbance was determined in a spectrophotometer at 492 nm. A cutoff point for optimal sensitivity and specificity in ELISA tests was determined using receiver operating characteristic (ROC) curve analysis (Metz, 1978; Zweig and Campbell, 1993). The statistical analyses were performed using MedCalc Statistical Software (version 13.2.0).

For the IFAT assay, standardization of the technique was achieved with progressive dilutions of positive and negative control serum (1:20 to 1:320) against progressive dilutions of the conjugate (1:50 to 1:200), on five slides. The serum samples were screened in 1:40 dilution. The reactive sera were serially titrated up to a 1:640 dilution. The IgG conjugate (fluorescein isothiocyanate – Sigma) was used at 1:150 dilutions in 10% Evans Blue, from the previous titration. Each series of serum samples was run with positive and negative controls. The slides were analyzed

using fluorescence microscopy (HBO 200 bulb and BG 12 filter).

DNA was extracted from the leukocyte layer of blood using the standard phenol–chloroform method (Sambrook and Russel, 2001). After ethanol precipitation, DNA was resuspended in 50 μL ultra-pure water, incubated with RNase A (10 mg/mL) at 37 °C for 1 h, and stored at –20 °C until PCR realization. To amplify the 145 pb of the conserved region of the *L. infantum* DNA fragment, the primers RV1F and RV2R were used (Lachaud et al., 2002). The PCR was performed at a final volume of 25 μL containing 5 μL of DNA, 1× buffer, 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 pmol of each primer (F and R), 2 U Taq polymerase (Invitrogen), and water up to the final volume. The reaction condition consisted of an initial denaturation at 94 °C for 5 min. This was followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 59 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR product was analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV. *L. infantum* DNA was used as a positive control, and DNA from uninfected dogs, as well as the addition of no DNA, were used as negative controls of the assay. All DNA extraction procedures were performed in separate rooms to prevent contamination.

Prevalence was calculated according to the formula: number of positive dogs/sampled population. The Chi square test ( $\chi^2$ ) was used to compare prevalence rates among sex, age, breed, clinical signs, and place of origin. A *p* value of ≤0.05 was the criterion for significance.

Among the 252 dogs investigated, 74.7% were from rural areas with forests close to the home, the presence of other mammals (opossums, rodents, horses and donkeys), and, in most cases, the presence of organic matter in the peridomestic area or close by. Concerning the canine population studied, 82.5% had no definite breed, 59.5% were male, 74.5% were aged 2 to 6 years old, and 86.5% were native to the region and had not been in another state for at least two years (Table 1). A statistically significant difference was observed, with a greater number of positive dogs among deer–hound breeds and those aged 7 to 10 years old (*p* ≤ 0.05). This indicates that deer–hound breeds, known for hunting activity, are more susceptible to exposure to the vector because they live in woods and forests. More positive results among older dogs indicate a greater period at risk of being bitten and decreased immunity, which increases the chances of acquiring the disease.

For the ELISA method, the diagnostic performance was sensitivity of 100% (CI95%: 91.4–100%), specificity of 99.3% (CI95%: 97.4–99.9), area under the ROC curve (AUC): 0.999, Youden index: 0.993, *p* < 0.0001, likelihood ratio of a positive test (LR+): 135 and a negative (LR–): 0. Of the total serum samples surveyed, 41/252 were positive. Forty-three dogs were positive by IFAT assay, with 43 showing titers of 1/40, 33 with 1:80 and 25 ≥ 1:160. Fifty-five dogs were positive by PCR, 63.6% were asymptomatic (Table 2). Forty-eight dogs were positive for VL by both serological and molecular methods. The remaining 197 dogs were negative. Data analysis revealed that positive diagnosis was statistically associated with the symptomatology, breed, and age (*p* ≤ 0.05) of the dogs.



**Table 1**  
Epidemiological data and characteristics of the dogs studied.

Environmental conditions	Number (%) total residences	Number (%) positive dogs
Location of residence		
Rural area	56 (74.7)	35 (72.9)
Urban area	19 (25.3)	13 (27.1)
Presence of forest close to the residence		
Riparian forest	5 (6.7)	1 (2.1)
Native forest	37 (49.3)	25 (52.1)
Reforestation	15 (20.0)	12 (25.0)
Reforestation + native forest	14 (18.7)	10 (20.8)
No forests	4 (5.3)	0 (0.0)
Presence of forest within 300 m of the residence		
Presence	27 (36.0)	17 (35.4)
Absence	48 (64.0)	31 (64.6)
Presence of other animals		
Presence	71 (94.7)	48 (100.0)
Absence	4 (5.3)	0 (0.0)
Presence of organic matter in the yard		
Presence	73 (97.3)	48 (100.0)
Absence	2 (2.7)	0 (0.0)
Dog characteristics	Number (%)	
Breed		
No defined breed	208 (82.5)	35 (72.9)
Fila Brasileiro	17 (6.7)	0 (0.0)
Veadeiro Brasileiro	11 (4.4)	10 (20.8)
Others	16 (6.3)	3 (6.3)
Age		
Up to 1 year old	38 (15.1)	4 (8.3)
2 to 6 years old	188 (74.6)	23 (47.9)
7 to 10 years old	21 (8.3)	15 (31.3)
Over 10 years old	5 (2.0)	6 (12.5)
Sex		
Male	150 (59.5)	27 (56.3)
Female	102 (40.5)	21 (43.8)
Hunting dogs		
Yes	25 (9.9)	15 (31.2)
No	234 (90.1)	33 (68.8)

Among the 48 dogs positive by both serological and molecular methods, 19 (39.6%) presented clinical signs of VL. The most common clinical manifestations observed were skin alterations in 31.2% (alopecia, ulcerative lesions, and hyperkeratosis), weight loss (27.1%), onychogryphosis (25.0%), lymphadenopathy (20.8%), or anorexia (12.5%). Visceral leishmaniosis in dogs can exhibit a large spectrum of clinical presentations with variable degrees of severity

**Table 2**  
Number and percentage of dogs positive for visceral leishmaniosis following serological (IFAT and ELISA) and molecular (PCR) tests and relationship with clinical presentation.

Clinical form	Method	Number of positive dogs	% of positivity
Symptomatic	ELISA	19	46.4
	IFAT	17	39.6
	PCR	20	36.3
Asymptomatic	ELISA	22	53.6
	IFAT	26	60.4
	PCR	35	63.6

(Dantas-Torres, 2006; Rondon et al., 2008; Baneth et al., 2008; Cunha et al., 2012).

In our study, an average of 59.2% of positive dogs were asymptomatic (Table 2). These results were supported by other works (Dantas-Torres, 2006; Rondon et al., 2008; Cunha et al., 2012; Steindel et al., 2013), confirming that asymptomatic dogs act as parasite reservoirs, playing an important role in the maintenance of the parasite transmission cycle (Cardoso et al., 2012; Mohammadiha et al., 2013). The capacity to infect phlebotomines is higher for symptomatic (28%) than asymptomatic dogs (5.4%) (Michalsky et al., 2007). In a recent study in Florianópolis of 11 dogs with VL, 90.9%, including four asymptomatic dogs, presented high skin parasitism, as demonstrated by histopathology (Steindel et al., 2013). Therefore, under favorable conditions (higher sandfly density), asymptomatic dogs can contribute to parasite transmission, and the infection can spread and infect humans.

In summary, this work shows that of the 252 dogs investigated, 16.7% of them presented clinical signs of VL, 21% presented positive serology (ELISA + IFAT), and 21.8% were positive when tested by PCR. These results are supported by other studies in molecular epidemiology. For example, in Spain, 13% of dogs apparently presented clinical disease; 26% were seropositive and 63% were positive when PCR was used as a diagnostic technique (Solano-Gallego et al., 2001). In Greece, 12.3% of dogs presented anti-*Leishmania* antibodies and 63% were positive using the molecular technique (Leontides et al., 2002). This preliminary study confirms that the presence of CVL in the municipalities of São Miguel do Oeste and Descanso in the western region of Santa Catarina State means the occurrence of an outbreak is possible, as is the appearance of human cases in the future. The characteristics of the epidemiological cycle of VL in this region remain to be determined. A phylogeny study will provide important information regarding whether the parasite arrived in this region from neighboring Argentina or the States of Parana or Rio Grande do Sul.

## Acknowledgment

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ - 307387/2011-9) for its financial support.

## References

- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend Parasitol.* 24, 324–330.
- Cunha, R.C., Andreotti, R., Silva, E.A., Pereira, E., Thomaz Soccol, V., 2012. Laboratory diagnosis and clinical signs of canine visceral leishmaniasis in dogs examined at the center for zoonosis control in Campo Grande-MS. *Braz. Arch. Vet. Sci.* 17, 17–26.
- Cardoso, L., Mendão, C., Carvalho, L.M., 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal—a national serological study. *Parasites Vectors* 5, 62.
- Castro, E.A., Thomaz-Soccol, V., Argur, C., 2003. Standardization of ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) and indirect fluorescent antibody test (IFAT) techniques for canine cutaneous leishmaniasis. In: Roussos, S., et al. (Eds.), *New Horizons in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland, pp. 421–428 [S.I.].



- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., Campino, L., 2012. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet. Parasitol.* 189, 189–196.
- Cruz, I., Acosta, L., Gutiérrez, M.N., Nieto, J., Cañavate, C., Deschutter, J., Bornay-Llinares, F.J., 2010. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect. Dis.* 10, 342.
- Dantas-Torres, F., 2006. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Rev. Saúde Pública* 40, 537–541.
- Deboni, S.C., Barbosa, M., Ramos, R.R., 2011. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. *Bolm. Epidemiol.* 13, 1–3.
- Dias, R.C.F., Thomaz Soccol, V., Bisetto Júnior, A., Pozzolo, E.M., Chiyo, L., Freire, R.L., Mitsuka, B.R., Pasquali, A.K.S., Alban, S., Fendrich, R.C., Caldart, E.T., Navarro, I.T., 2013. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. Antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil. In: Fifth World Congress on Leishmaniasis, Paraná, Brazil, pp. 826.
- Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.P., Mylonakis, M.E., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19–27.
- Maia-Elkhoury, A.N.S., Alves, W.A., Sousa-Gomes, M., Sena, J., Lana, E., 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública* 24, 2941–2947.
- Marzochi, M.C.A., Fagundes, A., Andrade, M.V., Souza, M.B., Madeira, M.F., Mouta-Confort, E., Schubach, A.O., Marzochi, K.B.F., 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco epidemiological aspects and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 570–580.
- Metz, C.E., 1978. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* 8, 283–289.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67–76.
- Mohammadiha, A., Haghighi, A., Mohebbali, M., Mahdian, R., Abadi, A.R., Zarei, Z., Yeganeh, F., Kazemi, B., Taghipour, N., Akhouni, B., Barati, M., Mahmoudi, M.R., 2013. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* 192, 83–90.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18, 399–405.
- PDM-São Miguel do Oeste, 2009. Plano Diretor Municipal, PDM-São Miguel do Oeste, São Miguel do Oeste, SC.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A., 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11, 1633–1644.
- Rondon, F.C., Bevilacqua, C.M.L., Franke, C.R., Barros, R.S., Oliveira, F.R., Alcântara, A.C., Diniz, A.T., 2008. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 155, 24–31.
- Salomon, O.D., Sinagra, A., Nevot, M.C., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J.O., Riarte, A., Estevez, J., 2008. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 109–111.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Steindel, M., Menin, A., Evangelista, T., Stoco, P.H., Marlow, M.A., Fleith, R.C., Pilati, C., Grisard, E.C., 2013. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 33, 490–496.
- Szargiki, R., Castro, E.A., Luz, E., Kowalchuk, W., Machado, A.M., Thomaz Soccol, V., 2009. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 47–52.
- Thrusfield, M.V., 2004. *Epidemiologia Veterinária*, 2<sup>a</sup> 11 d. Roca, São Paulo, 556 p.
- Zweig, M.H., Campbell, G., 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561–577.